

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Romana Jarošová

## ELEKTROCHEMICKÉ STANOVENÍ CARBOXINU NA UHLÍKOVÉ PASTOVÉ ELEKTRODĚ

Electrochemical determination of carboxin using carbon  
paste electrode

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Hana Dejmková

Praha 2013

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně, pod vedením Mgr. Hany Dejmkové, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 1. května 2013

.....

podpis

Tato práce byla finančně podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR (projekt MSM 0021620857), Univerzitou Karlovou v Praze (projekt SVV2012-265201) a Grantovou agenturou České republiky (projekt P206/12/G151).

## **Poděkování**

Ráda poděkovala své školitelce Mgr. Hance Dejmkové, a to nejen za odborné vedení, cenné rady a ochotu kdykoliv konzultovat vzniklé problémy, ale také za motivaci a neocenitelnou psychickou podporu, když už to vypadalo bledě. Panu prof. RNDr. Jiřímu Zimovi, CSc. děkuji za nové nápady, rady a konstruktivní kritiku.

Za zájem o výsledky mého měření, stejně jako za přátelské a povzbuzující prostředí děkuji také všem kamarádům z laboratoře č. 112.

Velké poděkování patří také mé mamince Marcele Jarošové, která mi po celou dobu studia pevně věřila a neúnavně mě podporovala.

## Abstrakt

Pesticidy jsou látky široce používané k zamezení výskytu plevelu, hmyzu a hub na rostlinách, krmivu a potravinách. Během dlouhé doby jejich často předimenzovaného použití kontaminovaly pesticidy celé životní prostředí. K nejvíce postiženým patří vodní ekosystém; pesticidy v něm mohou představovat obrovské nebezpečí pro živé organismy a primární zdroje pitné vody. Je proto nezbytné vyvíjet takové analytické metody, které budou schopny obsah těchto látek spolehlivě monitorovat.

Předmětem této diplomové práce bylo nalezení optimálních podmínek pro stanovení carboxinu metodou diferenční pulsní voltametrie (DPV) a vysokoúčinné kapalinové chromatografie se spektrofotometrickou detekcí (HPLC-UV) a s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED) na uhlíkové pastové elektrodě (CPE) a nalezení co nejnižších mezí detekce ( $L_D$ ). Dále byla ověřena aplikovatelnost metody na stanovení studované látky v matrici říční a pitné vody. Protože častým cílem nově vyvíjených metod je mimo jiné přenositelnost a použitelnost v terénu, zabývá se tato práce také možnostmi využití miniaturizované uhlíkové pastové elektrody (mCPE).

Jako optimální prostředí pro voltametrické stanovení carboxinu na CPE a mCPE bylo zvoleno prostředí BR pufru o pH 2 a methanolu (1%, V/V), ve kterém byly následně proměřeny kalibrační závislosti v rozmezí koncentrací  $1 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Mez detekce byla stanovena na  $1,1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v případě použití CPE, v případě použití mCPE pak  $3,3 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

V další části práce byly proměřeny koncentrační závislosti pomocí HPLC-ED a HPLC-UV. Mobilní fázi zde byla směs BR pufru o pH 5,5 a methanolu v poměru 40:60 (V/V), potenciál pracovní elektrody +1,2 V a detekční vlnová délka 251 nm. Mez detekce byla stanovena na  $1,1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  s využitím HPLC-ED a  $8,1 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  s využitím HPLC-UV.

Meze detekce v modelových vzorcích říční vody byly řádově  $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  pro obě použité metody i oba typy elektrod. Stanovení carboxinu v modelových vzorcích tedy nebylo matricí vzorku nijak významně ovlivněno.

## Abstract

Pesticides are substances widely used for preventing damage by weeds, insects and fungi on plants, feedstuffs, foodstuffs, etc. Those compounds were often overused and this resulted in widespread contamination of the environment. Water ecosystem is the most endangered one – pesticides possess a huge risk for living organisms and primary sources of drinking water. Therefore, development of new analytical methods utilizable for reliable monitoring of these substances in environment is of necessity.

Main objective of this diploma thesis was finding the optimal conditions for determination of carboxin using differential pulse voltammetry (DPV), high-performance liquid chromatography with spectrophotometric (HPLC-UV) and electrochemical (HPLC-ED) detection, latter using carbon paste electrode (CPE) as working electrode, reaching the lowest possible limits of detection ( $L_D$ ). Next objective was the application of the developed methods for the determination of carboxin in the sample matrix of river and drinking water. And since the recent trend in development of new analytical methods is their portability (usage *in situ*), application of miniaturized carbon paste electrode (mCPE) was investigated.

Optimal conditions for voltammetric determination using CPE and mCPE were: mixture of Britton-Robinson buffer solution ( $\text{pH} = 2$ ) and methanol (1%, V/V). Calibration dependences were then measured in this solution, in the concentration range from  $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  to  $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Achieved limits of detection were  $1.1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  using CPE and  $3.3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  when mCPE was used.

Calibration dependences using HPLC-ED and HPLC-UV were further measured. Mobile phase consisted of Britton-Robinson buffer solution ( $\text{pH} = 5.5$ ) and methanol in 40:60 ratio (V/V). In case of HPLC-ED, potential of the working electrode was +1.2 V. For HPLC-UV, optimal absorption wavelength was 251 nm. Achieved limit of detection for HPLC-ED was  $1.1 \times 10^{-7}$ ; for HPLC-UV the achieved  $L_D$  was  $8.1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ .

Limits of detection in samples of river water were in  $10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  concentrations for both methods and electrodes used. Determinations in model samples were not significantly afflicted by the samples matrix.

**Předmětová hesla:** analytická chemie  
elektrochemie  
voltametrie  
vysokoúčinná kapalinová chromatografie  
extrakce tuhou fází  
pesticidy

**Klíčová slova:** carboxin  
diferenční pulsní voltametrie  
elektrochemická detekce  
UV spektrofotometrická detekce  
uhlíková pastová elektroda  
miniaturizovaná elektroda  
modelové vzorky pitné a říční vody

---

**Objective words:** Analytical Chemistry  
Electrochemistry  
Voltammetry  
High Performance Liquid Chromatography  
Solid Phase Extraction  
Pesticides

**Key Words:** Carboxin  
Differential Pulse Voltammetry  
Electrochemical Detection  
UV Spectrophotometric Detection  
Carbon Paste Electrode  
Miniaturized Electrode  
Model Samples of Drinking and River Water

# OBSAH

<b>1</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>11</b>
1.1	Cíl práce .....	11
1.2	Pesticidy .....	11
1.3	Carboxin.....	13
1.4	Metody stanovení carboxinu .....	14
1.5	Uhlíková pastová elektroda.....	16
<b>2</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>17</b>
2.1	Studovaná látka .....	18
2.2	Použité chemikálie .....	19
2.3	Použité aparatury.....	19
2.3.1	Voltametrické techniky.....	19
2.3.2	Chromatografická aparatura .....	21
2.3.3	Extrakce tuhou fází .....	22
2.3.4	Další použitá zařízení .....	22
2.4	Pracovní postupy .....	22
2.4.1	Příprava roztoků.....	22
2.4.2	Příprava uhlíkové pastové elektrody .....	23
2.4.3	DPV stanovení na CPE.....	23
2.4.4	HPLC stanovení s ED a UV detekcí.....	24
2.5	Studium stálosti zásobního roztoku carboxinu .....	25
<b>3.</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>27</b>
3.1	Voltametrické stanovení carboxinu na CPE .....	27
3.1.1	Vliv pH na stanovení carboxinu .....	27
3.1.2	Opakovatelnost měření .....	29
3.1.3	Vliv obsahu methanolu na stanovení carboxinu .....	31
3.1.4	Vliv akumulace carboxinu na CPE.....	32
3.1.5	Kalibrační závislosti .....	33
3.1.6	Modelové vzorky .....	36

3.2	Voltametrické stanovení carboxinu na mCPE .....	42
3.2.1	Vliv pH na stanovení carboxinu .....	42
3.2.2	Opakovatelnost měření .....	44
3.2.3	Vliv obsahu methanolu na stanovení carboxinu .....	46
3.2.4	Kalibrační závislosti .....	47
3.2.5	Modelové vzorky .....	50
3.3	Stanovení carboxinu pomocí HPLC se spektrofotometrickou a elektrochemickou detekcí .....	56
3.3.1	Optimalizace podmínek měření .....	56
3.3.2	Opakovatelnost měření .....	57
3.3.3	Kalibrační závislosti .....	59
3.3.4	Modelové vzorky .....	64
3.4	Extrakce tuhou fází .....	73
3.4.1	Optimalizace podmínek pro extrakci tuhou fází.....	73
<b>4.</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>76</b>
<b>5.</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>78</b>



## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<i>A</i>	absorbance
<i>A<sub>p</sub></i>	plocha píku
AU, mAU	jednotky absorbance
BR pufr	Brittonův-Robinsonův pufr
<i>c</i>	molární koncentrace
C.A.S.	Chemical Abstracts Service
CPE	uhlíková pastová elektroda (Carbon paste electrode)
mCPE	miniaturizovaná uhlíková pastová elektroda
DAD	detektor diodového pole (Diode array detector)
DME	kapající rtuťová elektroda (Dropping mercury electrode)
DPV	diferenční pulsní voltametrie
<i>E</i>	potenciál
<i>E<sub>p</sub></i>	potenciál píku
ED	elektrochemická detekce
ES	Evropská směrnice
GC	plynová chromatografie (Gas chromatography)
<i>h<sub>p</sub></i>	výška píku
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-performance liquid chromatography)
<i>I</i>	elektrický proud
<i>I<sub>p</sub></i>	elektrický proud píku
$\lambda$	vlnová délka
LC	kapalinová chromatografie (Liquid chromatography)
<i>L<sub>D</sub></i>	mez detekce (Limit of detection)
MS	hmotnostní spektrometrie (Mass spectrometry)
MSPD	extrakce disperzní tuhou fází (Matrix solid phase dispersion)
<i>M<sub>r</sub></i>	relativní molekulová hmotnost
<i>n</i>	počet měření
p.a.	pro analýzu
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity hydroxoniových iontů
p <i>K<sub>a</sub></i>	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty

$\rho$	hustota
$R$	korelační koeficient
RP	reverzní fáze
RP-18	reverzní fáze s chemicky vázaným oktaedecylsilanem
$Q$	průtoková rychlost mobilní fáze
$s$	směrodatná odchylka
$s_r$	relativní směrodatná odchylka
SPE	extrakce tuhou fází (Solid phase extraction)
$t$	čas
$t_{aku}$	doba akumulace
TSP	thermospray
V/V	poměr objemů
UV	ultrafialová oblast
VIS	viditelná oblast

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Cíl práce

Pesticidy jsou látky široce používané k ochraně plodin proti různým škůdcům. Jejich používání přináší nesporné výhody v oblasti zemědělské produkce, ale opakované a často nadměrné užívání některých pesticidů může vést k jejich akumulaci v rostlinách, živočiších, vodách či půdě, což vede k širokému zamoření celého ekosystému. Stinnou stránkou aplikování pesticidů je také vznik reziduí, která zůstávají na rostlinách a představují tak potenciální riziko pro spotřebitele. Potraviny s největší dávkou pesticidů jsou ovoce a zelenina.

Tato diplomová práce se zabývá nalezením optimálních podmínek pro stanovení pesticidu carboxinu metodou diferenční pulsní voltametrie a vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí na uhlíkové pastové elektrodě a spektrofotometrickou detekcí, následné porovnání obou metod a stanovení co nejnižších mezí detekce. Dále se práce zabývá ověřením možnosti využití miniaturizovaného voltametrického elektrodového systému, použitelného v 1 ml objemu vzorku. Praktická aplikovatelnost metod byla ověřena na stanovení studované látky v matrici pitné a říční vody.

## 1.2 Pesticidy

První zmínka o pesticidech se objevuje již před rokem 1000 př. n. l., kdy byla k potírání chorob kulturních rostlin a k zapuzování hmyzu používána síra formou fumigantu. První přírodní pesticidy, a to rotenon z kořene derrisu a pyrethrum z květu chryzantémy, byly zavedeny kolem roku 1850 a jsou dodnes používanými insekticidy [1]. Největší zlom v oblasti pesticidů nastal v roce 1939, kdy Dr. Paul Müller objevil silné insekticidní vlastnosti dichlordifenyiltrichlorethanu, neboli DDT.

Účinné látky pesticidů jsou chemikálie používané proti škodlivým živočichům, plevelům a parazitickým houbám, které ohrožují zemědělské, zahradní a lesní rostliny, zásoby potravin a zemědělských produktů či průmyslové materiály (textil, kůži a dřevo) [2].

Používání pesticidů je nedílnou součástí pěstebních technologií zemědělských plodin. Podle Americké agentury pro ochranu životního prostředí jsou pesticidy

definovány jako látky nebo směsi látek určených k prevenci, ničení a zmírnění poškození způsobeného škůdci [3]. Evropské směrnice (ES) pak pesticidy definuje jako „přípravky na ochranu rostlin definované v nařízení ES o uvádění přípravků na ochranu rostlin na trh“ [4].

Ačkoliv je používání pesticidů z hlediska ochrany zemědělských produktů bezesporu výhodné a nepostradatelné, jejich vliv na přirozené fungování ekosystému a zdraví člověka je z velké části nepříznivý. Mnohé studie naznačují, že některé pesticidy povolené k užívání v rámci Evropské Unie mohou působit na vývoj nervové soustavy a způsobit tak vážné a nezvratné poškození vývoje mozku. Řada pesticidů může zvyšovat také riziko vzniku leukémie u dětí, narušovat hormonální systém u lidí a zvířat či působit jako endokrinní disruptory [5-8].

Nejčastější dělení pesticidů zohledňuje jejich použití proti škodlivým činitelům; nejrozšířenějšími skupinami jsou fungicidy (ochrana před houbovými chorobami), insekticidy (hmyzem), herbicidy (rostlinnými plevely), rodenticidy (hlodavci) a baktericidy (bakteriemi), ostatní skupiny pesticidů nejsou příliš významné. Podle způsobu dosažení účinku se pesticidy dělí na kontaktní a systémové. Kontaktní pesticidy zůstávají po aplikaci pouze na povrchu rostliny, naopak pesticidy systémové pronikají do pletiv, kde se pomocí cévních svazků dostávají do dalších částí rostlin. Protože kontaktní pesticidy působí určitou dobu uvnitř rostliny, chrání také nové přírůstky, avšak v porovnání s pesticidy kontaktními jsou náchylnější ke vzniku rezistence [9]. Poslední možná klasifikace rozděluje pesticidy podle chemické povahy aktivní složky na organofosfáty, karbamáty, chlororganické sloučeniny, pyretroidy, fenoly, morfoliny, azoly, aniliny a další [10].

Účinnost pesticidů významně ovlivňují i jejich fyzikálně chemické vlastnosti. Vysoká rozpustnost pesticidů ve vodě usnadňuje pronikání pesticidů do půdních vrstev, avšak na druhé straně bývá častou příčinou vyplavení pesticidů z půdy. Další významnou vlastností je těkavost pesticidů; velká těkavost je podmínkou pro účinnost půdních fumigantů (pesticidů aplikovaných ve formě par nebo plynu), avšak manipulace s tímto druhem fungicidů je obtížnější a látky musí být okamžitě zapracovány do půdy. Neméně důležitými fyzikálně-chemickými vlastnostmi jsou dále tvar a rozměr molekul či vyluhování pesticidů z půdy [11].

I když nejsou pesticidy ve většině případů snadno rozložitelné, podléhají v určitém časovém horizontu degradaci, jejímž výsledkem mohou být toxické formy.

Nejčastějšími fyzikálními faktory uplatňujícími se při degradaci pesticidů je světlo a teplo. Jeden z nejdůležitějších procesů vedoucích k eliminaci z životního prostředí je fotolýza residuí. Spolu se singletovým kyslíkem hrají důležitou roli také hydroxylové, superoxidové a další volné radikály vznikající při fotochemických reakcích. Nejvýznamnější reakcí, které pesticidy podléhají, je hydrolýza, rychlá zejména při extrémních hodnotách pH [12].

Z biologických činitelů se na degradaci pesticidů v půdě a vodném prostředí podílejí zejména mikroorganismy, tj. různé druhy plísní, bakterií a aktinomycet. Biodegradace pesticidů probíhá také v exponovaných rostlinách a živočiších; vznikající produkty se tak mohou nacházet i v lidském potravním řetězci [11].

### 1.3 Carboxin

Carboxin je systémový fungicid patřící do již zmiňované skupiny pesticidů anilinových, používaných ke kontrole nemoci rostlin způsobených houbami stopkovýtrusnými (*Basidiomycetes*) [13].

Jedná se o látku intenzivně aplikovanou nejen v různých stádiích kultivace, ale také během skladování plodin. Své využití nachází při ošetření osiva proti plísni, hnilobě či sněti ječmene, ovsu, rýže, bavlny, zeleniny, kukuřice a pšenice, ale také sóji, žita či řepky. Dále je tento fungicid používán pro prevenci vzniku plochých míst v travovém porostu. Carboxin může být používán nejen pro prevenci, ale také při léčbě již probíhajících nemocí, a to nejčastěji v kombinaci s jinými pesticidy, jako např. imidaclopridem či thiramem [14-17].

Carboxin vykazuje pouze nízkou akutní toxicitu pro savce; nejvyšší riziko (třída toxicity III – mírně toxický) představuje při orálním a dermálním užití. Mechanismus toxických účinků nebyl zcela prozkoumán, avšak primárními cílovými orgány se zdají být játra a ledviny. Ve studiích karcinogenity u potkanů a myší neprokázal carboxin žádný významný karcinogenní potenciál [18, 19]. Ačkoliv carboxin vykazuje nízkou toxicitu pro savce, přesto je jeho množství v potravinách z legislativních důvodů kontrolováno [16]. Velmi toxický je však carboxin pro vodní organismy; jeho toxické účinky na *Daphnia magna*, *Thamnocephalus platyurus*, *Brachionus calyciflorus* aj. jsou popsány ve studii [20].

Při studiu fotochemické degradace carboxinu ve vodě bylo zjištěno, že po čtyřech dnech vystavení vodného roztoku carboxinu slunečnímu záření se v roztoku

kromě samotného (nejvíce zastoupeného) carboxinu nachází také sulfoxid, ketoamid a jiné produkty. Fotochemická degradace carboxinu ve vodě je ovlivněna také pH prostředí [20].

Carboxin je velmi mobilní částice, která se v půdě vlivem aerobním metabolismem velmi rychle rozkládá, a to s poločasem rozpadu přibližně 1,25 dne. V případě anaerobního metabolismu jde o degradaci výrazně pomalejší, poločas rozpadu je pak přibližně 128 dní. V obou případech degradace vzniká s převládajícím zastoupením sulfoxid carboxinu, jež je oproti carboxinu odolnější a má také vyšší mobilitu v půdě. Toxicita obou látek je srovnatelná [18].

## 1.4 Metody stanovení carboxinu

Studovaná látka, carboxin, se nachází převážně v ovoci a zelenině; ve vodách a půdách dochází k jeho degradaci, proto byly vyvíjeny převážně takové metody, jež popisují stanovení carboxinu v různých plodinách. Většina analytických metod pro stanovení carboxinu a jeho reziduí je založena na kapalinové chromatografii (LC).

Ve studii [21] byl carboxin stanoven v environmentálních vzorcích pomocí HPLC. Byly použity dvě metody založené na oxidaci carboxinu chloridem železitým a následné chelataci vzniklého dvojmocného železa 1,10-fenantrolinem, resp. 2,2'-bipyridinem. Výsledný barevný produkt byl změřen pomocí HPLC s UV detekcí při vlnové délce 510, resp. 522 nm. Obě metody založené na charakteristických komplexních reakcích byly zhodnoceny jako selektivní, senzitivní a reproduktivní.

Pro stanovení carboxinu a jeho reziduí v hlávkovém zelí byla vyvinuta metoda [22]. Vzorky zelí byly extrahovány ethylacetátem, následovala extrakce tuhou fází (SPE). Stanovení bylo provedeno pomocí reversní kapalinové chromatografie se spektrofotometrickou detekcí při vlnové délce 205 nm. Výsledky byly potvrzeny plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (GC-MS), jež potvrzují použitelnost vyvinuté metody.

Lukova metoda [23] založena na extrakci pomocí směsi tří rozpouštědel odlišné polarity a metoda popsaná Rosalesem a Conradem [24], ve které byly vzorky sedimentů extrahovány v alkalickém prostředí za použití směsi amoniaku, vody a acetonitrilu, byla ve studii [25] testovaná a porovnána s metodou, která se zabývá stanovením vybraných reziduí pesticidů v říčních sedimentech metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí.

Pro monitorování a stanovení šesti pesticidů aplikovaných během kultivačního stádia na sóju byla vyvinuta metoda [26], jež využívá extrakce disperzní tuhou fází (MSPD) jako extrakční techniku a následnou analýzu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s detekcí diodovým polem (HPLC-DAD). Popsaná metoda byla shledána jako vhodná extrakční procedura pro složité a pevné matrice.

Ve vzorcích ovoce a zeleniny (jablek, brambor, rajčat aj.) byl stanovován obsah permanentních a tepelně nestálých pesticidů, a to pomocí HPLC-MS s termosprayovou ionizací [27]. Tato metoda je ceněna pro možnost vynechání derivatizačního kroku při stanovení carboxinu; použití hmotnostního detektoru pak ve srovnání s fluorescenčním či UV detektorem dává vyšší stupeň jistoty identifikace dané molekuly.

Využití plynové chromatografie s hmotnostní detekcí popisuje studie zabývající se stanovením více než 250 pesticidů a jejich metabolitů v ovoci a zelenině, např. v banánech, mrkvi, zelí či hrušek [28]. Extrakce a nakoncentrování bylo provedeno pomocí extrakce tuhou fází (SPE). Citlivost této metody odpovídá stanovení pesticidů a jejich residuů v potravinách a je ideální pro analýzu velkého počtu vzorků.

**Tab. 1.1**

Přehled vybraných prací zabývajících se stanovením carboxinu

metoda stanovení	mez detekce	jednotky	literatura
<b>HPLC</b>			
UV detekce, $\lambda=510$ nm a $\lambda=522$ nm	0,21 a 0,10	$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	21
<b>GC</b>	0,02	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	28
MS			
<b>RP HPLC</b>	0,02-0,06	$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	22
UV detekce, $\lambda=205$ nm			
<b>LC</b>	0,30	$\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$	25
MS/MS			
<b>HPLC</b>	0,04	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	26
DAD			
<b>HPLC</b>	0,25	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	27
TSP/MS			

## 1.5. Uhlíková pastová elektroda

Nebýt Ralpa Normana Adamse a jeho více než 50 let starého objevu, přišla by elektrochemie o jednu z nejvíce používaných elektrod, a sice uhlíkovou pastovou elektrodu (Carbon paste electrode, CPE) [29].

Za povšimnutí stojí fakt, že je tento objev úzce spojen s profesorem J. Heyrovským a jeho polarografií; CPE totiž byla původně zamýšlenou alternativou ke rtuťové kapající elektrodě (Dropping mercury electrode, DME), kterou nelze polarizovat v oblasti pozitivnějších potenciálů z důvodu anodické oxidace rtuti. Původní CPE tak byla zkonstruovaná podobně jako DME, sestávala z nádržky, ve které byl uhlíkový prášek s tekutinou připojený ke kapiláře, což umožňovalo pozorovat pravidelně se objevující kapičky uhlíkové elektrody. Ukázalo se však, že se tato kapající uhlíková elektroda experimentálně neosvědčila, avšak hustší směs uhlíkového prášku s organickou kapalinou, tzv. uhlíková pasta, se jevila jako slibný materiál s perspektivními vlastnostmi [30].

Uhlíková pastová elektroda je speciální druh heterogenních uhlíkových elektrod. Je složena z elektrodového pouzdra, dutý prostor elektrody je vyplněn uhlíkovou pastou (Obr. 1.1) [31].

Uhlíková pasta se skládá ze dvou hlavních složek, a to uhlíkového prášku a vhodného kapalného pojiva (pastovací kapaliny). Při přípravě nemodifikovaných, tj. dvousložkových uhlíkových past se uplatňují různé druhy uhlíkových prášků. Mezi nejběžnější patří spektrální grafitový prášek, uhlíkové mikrokuličky či uhlíkové nanotrubičky. Své využití však nacházejí také další materiály, jako např. retikulární skelný uhlík, grafen, naprášený nanouhlíkový film či uhlíková nanovlákná. Definovaná velikost, nízká absorpční schopnost a distribuce částic jsou pak nejdůležitější vlastnosti uhlíkových prášků. Pastovací kapalinou bývá inertní, elektrochemicky neaktivní a netěkavá látka, omezeně rozpustná ve vodě a nemísitelná s organickými rozpouštědly. V současné době bývá nejčastěji využíván silikonový, minerální či parafinový olej, ale nově své uplatnění nacházejí také organofosfáty či iontové kapaliny [32-36]. Nejběžnější poměr uhlíkového prášku a kapaliny je přibližně 1 g na 0,4-0,5 ml [37].

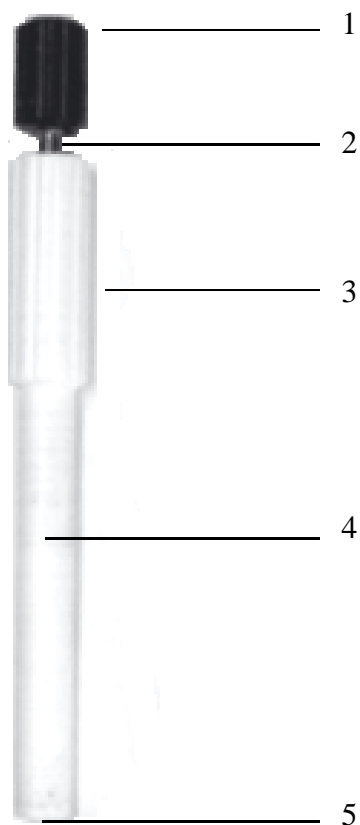
Mezi největší výhody uhlíkových pastových elektrod patří poměrně široký potenciálový rozsah, který je srovnatelný s běžnými uhlíkovými či platinovými elektrodami. V kyselých roztocích se pohybuje mezi přibližně -1,0 V až +1,5 V vs. SCE, v neutrálním prostředí -1,3 V až +1,4 V, v prostředí alkalickém pak -1,2 V až



+1,2 V [38]. CPE jsou ceněny také pro svou jednoduchou přípravu, nízké hodnoty zbytkových proudů a možnost chemických či biologických modifikací uhlíkové pasty [39]. Nezanedbatelnou stránkou je pak také velice snadná regenerovatelnost pasivovaného povrchu (postačující je otření uhlíkové pasty do navlhčeného filtračního papíru), dobrá opakovatelnost a reprodukovatelnost měření, jednoduchá robustní konstrukce [40] a nízká cena [41]. Typické meze detekce pro CPE jsou kolem  $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  [42].

Stinnou stránkou uhlíkových pastových elektrod je jejich omezené použití při potenciálech nižších než -0,5 V; CPE totiž vykazují nezanedbatelný proud vznikající v důsledku redukce kyslíku rozpuštěného v uhlíkové pastě [30]. Též nižší stabilita pasty v roztocích obsahujících větší množství organického rozpouštědla patří k nevýhodám CPE, tento problém však lze vyřešit použitím mikrokuliček skelného uhlíku [43].

Uhlíkové pastové elektrody našly své uplatnění nejen při voltametrických, amperometrických a potenciometrických měřeních [35], ale s úspěchem se využívají také při složitých analýzách organických směsí separačními metodami, a to při konstrukci elektrochemických detektorů ve spojení s průtokovou analýzou a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií [44-46].



**Obr. č. 1.1.**

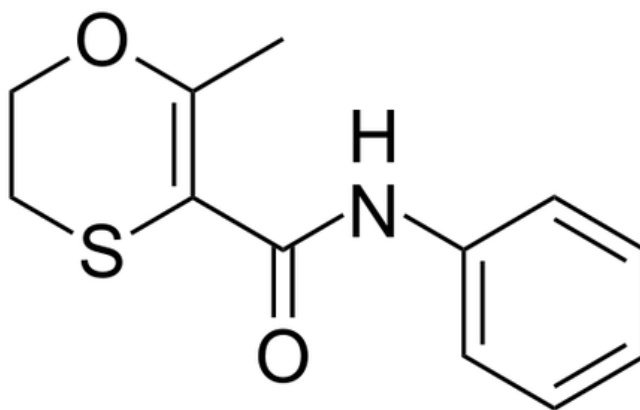
Pouzdro pro uhlíkovou pastovou elektrodu [30].

1. Teflonová hlava
2. Píst se závitem
3. Tělo elektrodového pouzdra
4. Dutý prostor naplněný uhlíkovou pastou
5. Koncový otvor

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Studovaná látka [47, 48]

Carboxin je bílý krystalický prášek bez zápachu. Jeho rozpustnost ve vodě je omezená (0,017 g/100 ml při teplotě 25 °C), dobře rozpustný je naopak v methanolu (21 g/100 ml), acetonu a dalších organických rozpouštědlech. Teplota tání carboxinu je 91 až 92 °C, rozkládá se před bodem varu.



**Obr. 2.1**  
Strukturní vzorec carboxinu.

IUPAC název: 5,6-dihydro-2-methyl-1,4-oxathiine-3-carboxanilide

C.A.S. název: 5,6-dihydro-2-methyl-*N*-phenyl-1,4-oxathiin-3-carboxamide

C.A.S. registrační číslo: 5234-68-4

Sumární vzorec: C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>S

$M_r = 235,31$

$pK_a = 0,5$  (při 25 °C)

## 2.2 Použité chemikálie

aceton (p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR)  
acetonitril (p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR)  
amoniak (26 %, p.a., Lachema, Brno, ČR)  
carboxin ( $\geq 99,9$  %, Aldrich, Německo)  
diethylether (p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR)  
dioxan (p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR)  
ethylester octové kyseliny (p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR)  
hydroxid sodný (p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR)  
isopropylaklohol (p.a., Lachema, Brno, ČR)  
kyselina boritá (p.a., Lachema, Brno, ČR)  
kyselina chlorovodíková (35%, p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR)  
kyselina *o*-fosforečná (85 %, p.a., Lachema, Brno, ČR)  
octová kyselina (99,8 %, p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR)  
methanol (p.a., Merck, Německo)  
methanol pro HPLC (Merck, Německo)  
mikrokuličky skelného uhlíku (0,4 – 12  $\mu\text{m}$ , Alfa Aesar, USA)  
minerální olej (Fluka Biochemika, Švýcarsko)  
toluen (p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR)  
tetrahydrofuran (p.a., Penta, Praha, ČR)  
deionizovaná voda (Millipore Q-plus Systém, Millipore, USA)

## 2.3 Použité aparatury

### 2.3.1 Voltametrické techniky

#### *Konvenční systém*

**Přístroj:** Eco Tribo Polarograph (Polaro-Sensors, Praha, ČR)

#### *Elektrody:*

- *pracovní:* uhlíková pastová elektroda tvořena teflonovým tělem s nerezovým pístem, aktivní plocha o průměru 2 mm
- *referentní:* argentchloridová elektroda s  $3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  KCl (ETP CZ R 006-05, Monokrystaly, ČR)

- *pomocná*: platinová plíšková elektroda

**Programové vybavení:** PolarPro verze 5.1 (Polaro-Sensors, Praha, ČR)

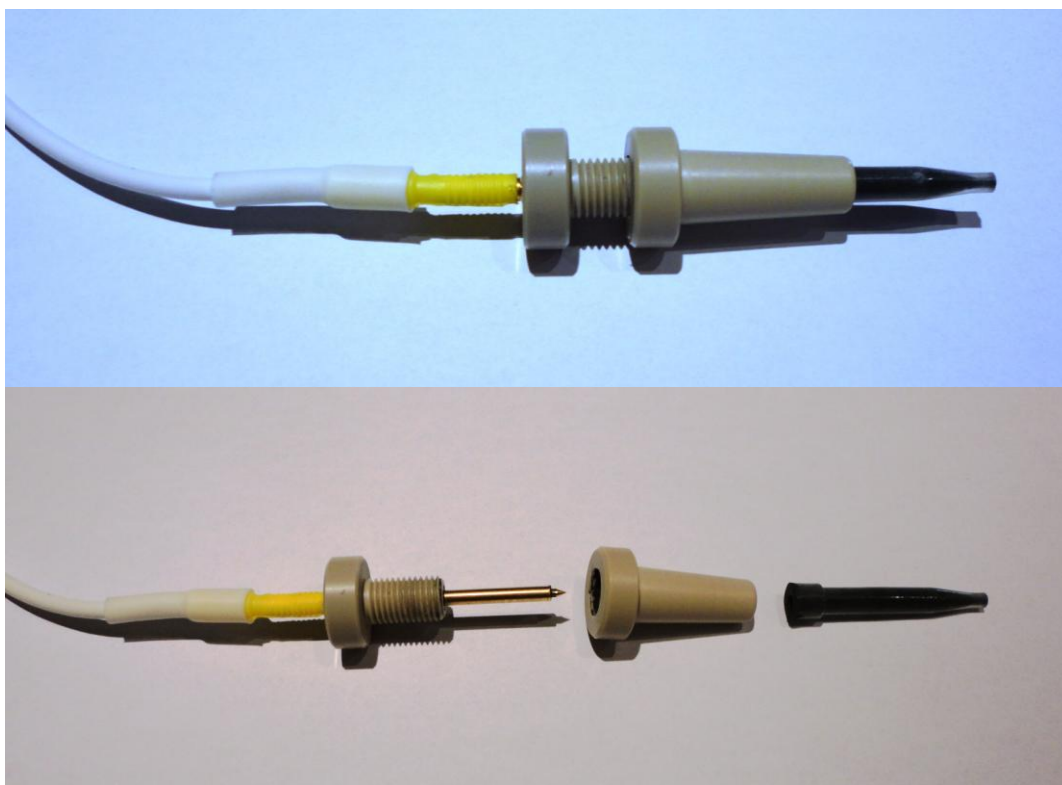
### **Miniaturizovaný systém**

**Přístroj:** PalmSens (PalmSens, Nizozemí)

#### **Elektrody:**

- *pracovní*: miniaturizovaná uhlíková pastová elektroda (Obr. 2.2), aktivní plocha o průměru 0,5 mm (BVT Technologies, Brno, ČR)
- *referentní*: argentchloridová elektroda s  $3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ KCl}$  (BVT Technologies, Brno, Česká republika)
- *pomocná*: platinový drátek

**Programové vybavení:** PSTrace verze 2.2 (PalmSens, Nizozemí)



**Obr. 2.2**  
Miniaturizovaná uhlíková pastová elektroda.

### 2.3.2 Chromatografická aparatura

**Kolona:** LiChroCART<sup>®</sup> 125-4, Purospher RP-18 (5 µm) (Merck, Německo)

**Předkolonka:** LiChroCART 4-4, Purospher RP-18 (5 µm) (Merck, Německo)

**Pumpa:** vysokotlaká pumpa HPP 5001 (Laboratorní přístroje, Praha, ČR)

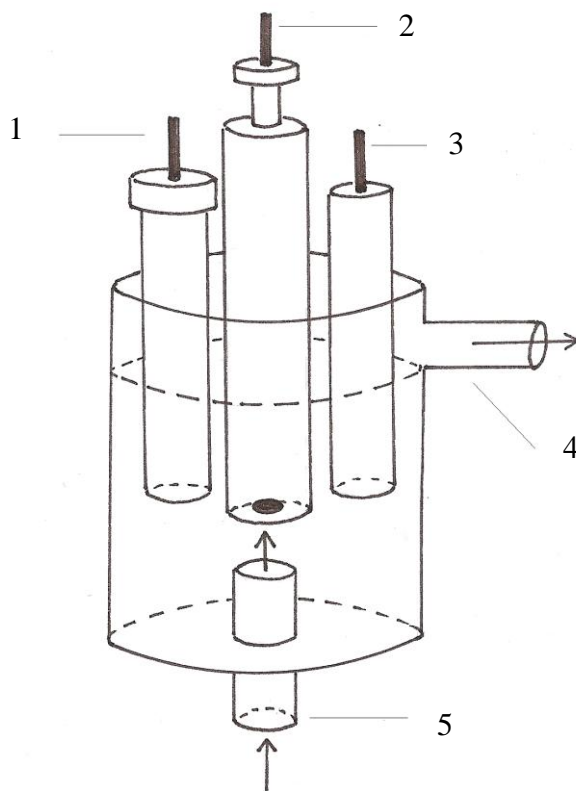
**Dávkovač:** LCI 30 (Laboratorní přístroje, Praha, ČR) se smyčkou o objemu 20 µl, plnění prováděno injekční stříkačkou

**Detektory:** *Spektrofotometrický UV/VIS detektor* Sapphire 800 (Ecom, ČR)

*Amperometrický detektor* ADLC 2 (Laboratorní přístroje, Praha, ČR)

**Elektrody:** stejné jako v případě DPV, zapojení typu wall-jet (Obr. 2.3)

**Programové vybavení:** Clarity 2.3 (Data Apex, ČR), pracující v prostředí Windows XP (Microsoft)



**Obr. 2.3**

Schematické znázornění uspořádání elektrod při amperometrické detekci [49].

1. referentní elektroda, 2. pracovní elektroda, 3. pomocná elektroda, 4. výstup, 5. vstup.

### 2.3.3 Extrakce tuhou fází

**SPE kolonky:** LiChrolut EN, 200 mg, 3 ml (Merck, Německo)

LiChrolut RP-18 E, 500 mg, 3 ml (Merck, Německo)

LiChrolut Si, 200 mg, 3 ml (Merck, Německo)

LiChrolut CN, 200 mg, 3 ml (Merck, Německo)

LiChrolut NH<sub>2</sub>, 200 mg, 3 ml (Merck, Německo)

Discovery DSC-18, 1 g, 6 ml (Aldrich, Německo)

### 2.3.4 Další použitá zařízení

**Spektrofotometr:** Agilent 8453 Diode-Array Spectrophotometer (USA), měřeno  
v křemenných kyvetách o tloušťce 1 mm

**pH metr:** digitální měřicí přístroj Conductivity and pH metr 3510 (Jenway, UK)  
s kombinovanou skleněnou elektrodou

**Odstranění vzduchu:** ultrazvuková čistička PSO200A (Powersonic, USA)

## 2.4 Pracovní postupy

### 2.4.1 Příprava roztoků

Zásobní roztoky carboxinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2}$  a  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  byly připraveny rozpuštěním přesně odváženého množství látky v methanolu. Zásobní roztok carboxinu v BR pufru pH 2 byl připraven stejným postupem, přesně odvážené množství látky bylo však doplněno BR puforem o pH 2. Roztoky o nižších koncentracích byly připravovány přesným ředěním zásobních roztoků. Roztoky byly uchovávány v temnu v chladničce při konstantní teplotě 5 °C.

Brittonův-Robinsonův pufr byl připraven smísením vodného roztoku hydroxidu sodného o koncentraci  $2 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  s vodným roztokem obsahujícím kyselinu boritou, octovou a kyselinu fosforečnou, všechny o koncentraci  $4 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Přesná hodnota pH byla měřena pH metrem.

Mobilní fáze byla připravena smísením methanolu (pro HPLC) a BR pufru o daném pH tak, aby vznikl roztok s objemovým podílem methanolu 60 %.

K přípravě všech vodných roztoků byla použita deionizovaná voda.

## 2.4.2 Příprava uhlíkové pastové elektrody

Uhlíková pasta byla připravena smísením 250 mg uhlíkových mikrokuliček o průměru 0,4 – 12  $\mu\text{m}$  a 100  $\mu\text{l}$  minerálního oleje v třecí misce, kde byla směs několik minut důkladně homogenizována. Před dalším použitím byla pasta nejméně 24 hodin uchována v plastové Eppendorfově zkumavce.

Po ustálení byla pasta důkladně napěchována do plastového těla miniaturizované elektrody, resp. teflonového těla elektrody pístového typu. Případné vzduchové bubliny způsobené plněním elektrody byly eliminovány utahováním nerezového pístu proti utěsněnému otvoru elektrody.

Takto připravené pracovní elektrody vydržely podle intenzity měření 1 až 2 měsíce.

## 2.4.3 DPV stanovení na CPE

Při voltametrickém stanovení carboxinu na CPE byl objem vzorku 10 ml, v případě využití mCPE pak 1 ml. Při proměřování opakovatelnosti, resp. vlivu pH základního elektrolytu na voltametrické chování carboxinu, byl vzorek připraven odpipetováním 1 ml zásobního roztoku carboxinu ( $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a doplněním do 10 ml BR pufrům příslušného pH.

Vzorky potřebné pro další optimalizační kroky byly připravovány obdobně, pouze s tím rozdílem, že byl upravován poměr methanolické složky. Do 10ml odměrné baňky bylo odpipetováno příslušné množství zásobního roztoku carboxinu v methanolu ( $c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ), přesné množství MeOH tak, aby odpovídalo požadovanému objemovému procentu a doplněno do 10 ml BR pufrům pH 2. Při proměřování vlivu akumulace byl použit zásobní roztok carboxinu v BR pufru.

Při proměřování závislosti voltametrických křivek carboxinu na koncentraci byly roztoky připravovány analogicky, a to s využitím zásobního roztoku o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , aby byl zajištěn 1% obsah methanolu (V/V). Slepý vzorek byl připraven odpipetováním 100  $\mu\text{l}$  methanolu a doplněním BR pufrům na objem 10 ml. Kalibrační závislosti byly měřeny v rozmezí od  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  směrem k nižším koncentracím.

Připravené vzorky byly důkladně promíchány a přelity do voltametrické nádoby, v případě mCPE byl z připraveného roztoku použit pouze 1 ml. Poté byl proveden záznam voltametrické křivky. Před prvním měřením nového dne byl povrch

pracovní elektrody obnoven otřením do navlhčeného filtračního papíru, další měření již obnovu povrchu elektrody nevyžadovala (viz kapitola 3.1.2).

Všechna voltametrická měření byla provedena v rozmezí potenciálu vkládaného na pracovní elektrodu 0 až + 1400 mV a s následujícími parametry: rychlost polarizace  $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , výška pulsu 50 mV a šířka pulsu 100 ms.

Koncentrační závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese; meze detekce byly stanoveny jako množství analytu poskytující signál, jehož výška je rovna trojnásobku velikosti směrodatné odchylky měření nejnižší stanovované koncentrace, vydělenému směrnici příslušné kalibrační závislosti.

Není-li uvedeno jinak, byla všechna voltametrická měření provedena třikrát.

#### **2.4.4 HPLC stanovení s ED a UV detekcí**

Vzorek pro optimalizaci chromatografického stanovení carboxinu byl připraven odpipetováním přesného množství zásobního roztoku carboxinu v methanolu ( $1\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a doplněn směsí deionizované vody s methanolem v poměru 1:1 (V/V) na celkový objem 10 ml.

Měření bylo provedeno na netermostatované koloně LiChroCART<sup>®</sup> 125-4, Purospher RP-18 (5 $\mu\text{m}$ ), dávkováno bylo 20  $\mu\text{l}$  roztoku při průtokové rychlosti mobilní fáze  $1,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Spektrofotometrický detektor pracoval při vlnové délce 251 nm, zvolené na základě UV-VIS spektra (viz kap. 2.5).

Elektrochemický detektor typu wall-jet pracující v tříelektrodovém uspořádání byl zapojen sériově za UV spektrofotometrický detektor. Povrch pracovní uhlíkové pastové elektrody byl upevněn ve vzdálenosti cca 1 mm od ústí kapiláry. Všechny tři elektrody byly ponořeny v mobilní fázi tak, aby nedocházelo ke vzájemnému kontaktu, resp. ke kontaktu se stěnami či dnem nádobky.

Kalibrační závislosti carboxinu byly proměřeny s využitím elektrochemického i UV spektrofotometrického detektoru.

Naměřená data byla zpracována metodou lineární regrese; meze detekce byly stanoveny jako množství analytu poskytující signál, jehož výška je rovna trojnásobku absolutní hodnoty šumu.

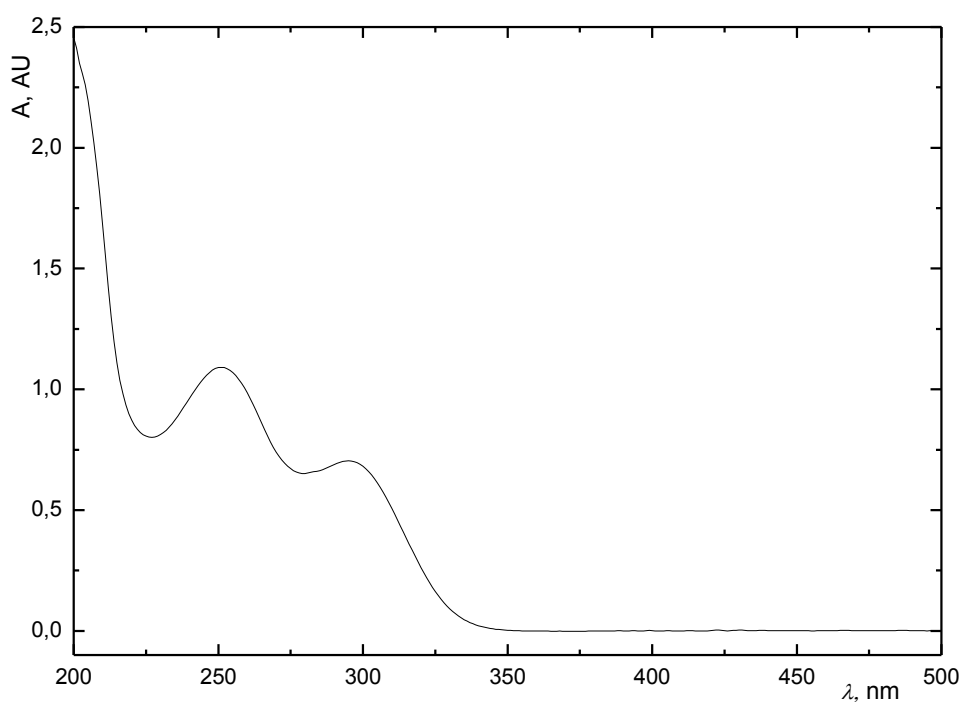
Všechny záznamy byly provedeny nejméně třikrát.



## 2.5 Studium stálosti zásobního roztoku carboxinu

Stálost zásobního roztoku carboxinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  byla sledována spektrofotometricky; UV-VIS spektrum bylo měřeno proti methanolu v 1mm křemenných kyvetách v rozmezí vlnových délek 200 – 700 nm. Hodnota absorbance byla odečítána při 251 nm, a to po dobu 18 měsíců (Tab. 2.1). Absorpční spektrum je zobrazeno na Obr. 2.4.

Ze zjištěných hodnot vyplývá, že v průběhu sledované doby nedošlo k výrazné změně absorbance carboxinu. Roztok je tedy při uchování ve tmě v chladničce při konstantní teplotě 5 °C stálý, a to nejméně 18 měsíců.



**Obr. 2.4**

Absorpční spektrum zásobního roztoku carboxinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Měřeno v křemenné kyvetě o tloušťce 1 mm proti methanolu.

**Tab. 2.1**Stálost zásobního roztoku  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  carboxinu v methanolu.

$t$ , dny	$\lambda = 251 \text{ nm}$	%
	$A$ , AU	
0	1,112	100,0
1	1,111	99,9
9	1,109	99,7
23	1,111	99,9
42	1,114	100,2
120	1,103	99,2
168	1,115	100,3
362	1,106	99,5
547	1,109	99,7

### 3. VÝSLEDKY A DISKUSE

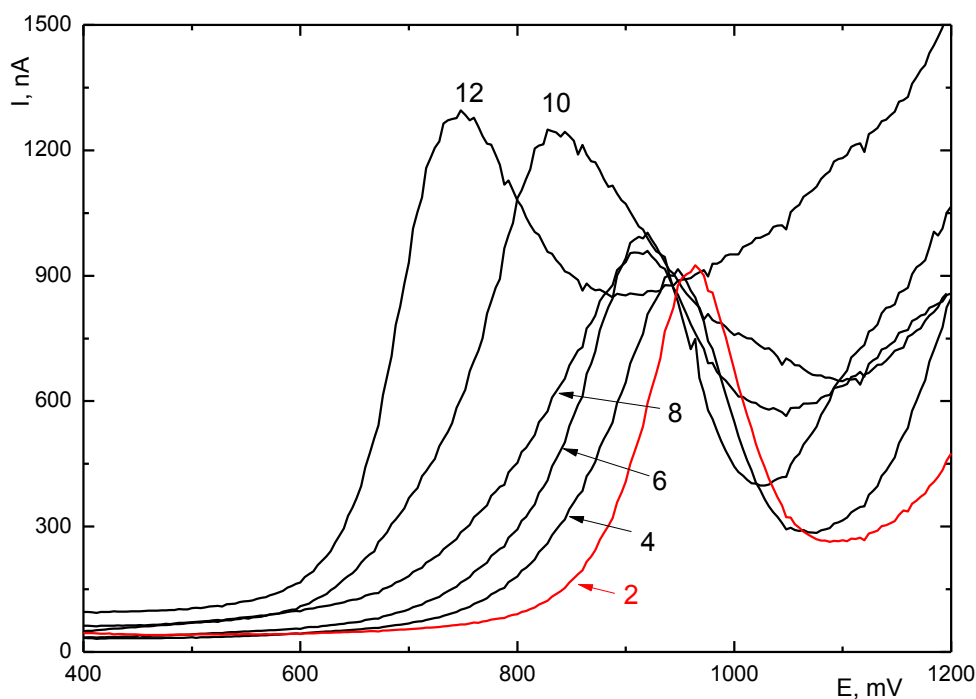
#### 3.1 Voltametrické stanovení carboxinu na CPE

##### 3.1.1 Vliv pH na stanovení carboxinu

Prvním krokem při vývoji metody pro stanovení carboxinu technikou DPV na CPE byla optimalizace pH BR pufru.

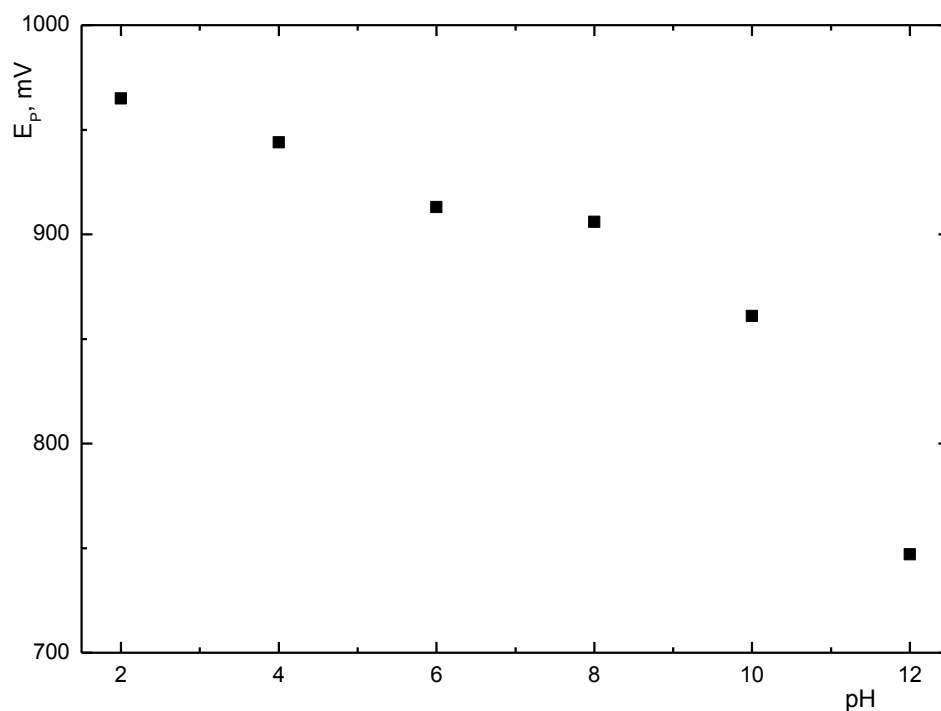
Vliv pH BR pufru na voltametrické chování roztoku carboxinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  byl sledován ve směsi BR pufru v rozmezí pH 2 až 12 a MeOH v poměru 90:10 (V/V). Voltametrické křivky byly proměřeny v rozmezí 0 do +1400 mV.

Naměřené voltamogramy jsou zobrazeny na Obr. 3.1. Je zde patrný posun píků po ose potenciálu se zvyšujícím se pH směrem k nižším potenciálům, doprovázený jejich rozšiřováním (Obr. 3.2). Na Obr. 3.3 lze naopak pozorovat, že kromě výraznějšího poklesu výšky píku při pH 8 je změna výšky píku se změnou pH pouze nevýrazná a nemá lineární charakter. S ohledem na uvedené skutečnosti bylo jako optimální zvoleno prostředí o pH 2, při kterém je pík nejlépe vykreslený a vyhodnotitelný.



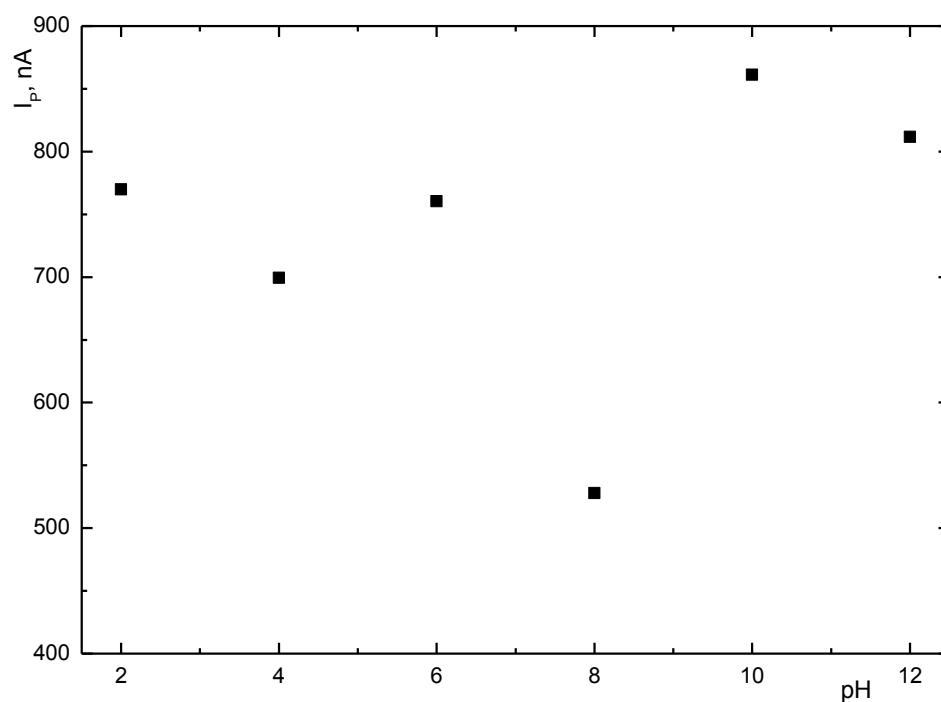
**Obr. 3.1**

Voltamogramy roztoku carboxinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v prostředí BR pufru a methanolu (90:10, V/V) naměřené při pH 2 až 12 (pH naznačeno u křivky). Měřeno metodou DPV na CPE.



**Obr. 3.2**

Závislost potenciálu píku carboxinu ( $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) na pH prostředí. Měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru s methanolem (90:10, V/V).



**Obr. 3.3**

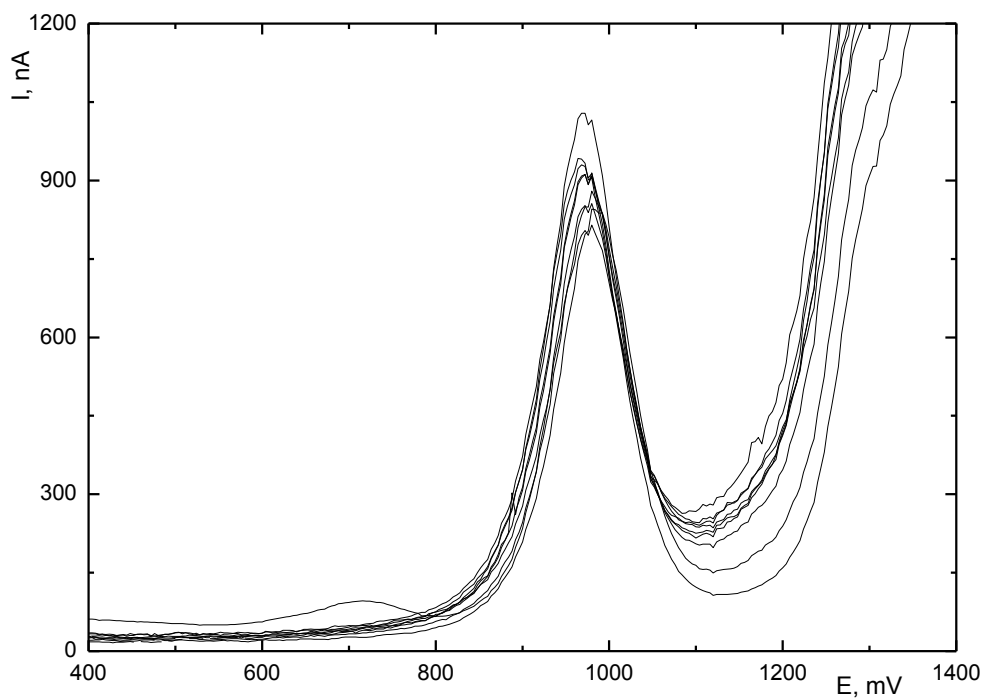
Závislost proudu píku carboxinu ( $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) na pH prostředí. Měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru s methanolem (90:10, V/V).

### 3.1.2 Opakovatelnost měření

Jedním z problémů doprovázejících elektrooxidace je často se vyskytující pasivace elektrodového povrchu. Dalším krokem pro vývoj metody stanovení carboxinu metodou DPV na CPE bylo proto ověření opakovatelnosti měření.

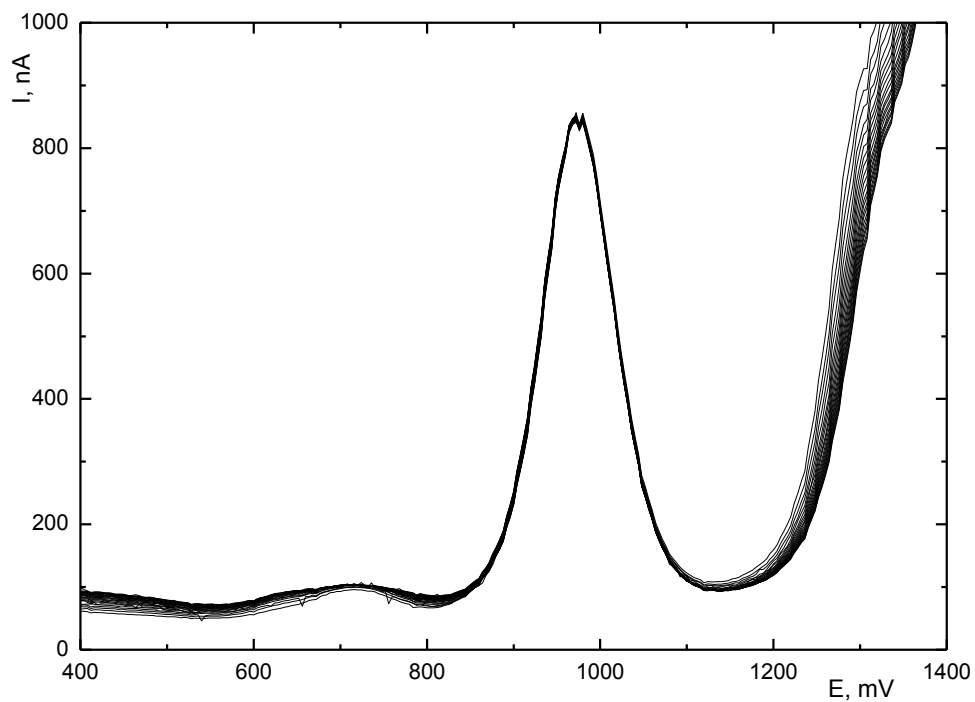
Opakovatelnost měření na CPE byla sledována za optimálních podmínek, a to deseti, resp. dvacetinásobným proměřením roztoku carboxinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  ve směsi BR pufr o pH 2 s methanolem v poměru 90:10 (V/V). Aby byl zaručen dostatečný transport analytu k povrchu elektrody, byl roztok carboxinu mezi jednotlivými měřeními vždy 5 sekund míchán. V první sérii měření byl elektrodový povrch mezi jednotlivými skeny obnovován mechanickým otřením do navlhčeného filtračního papíru, druhá série byla naměřena bez obnovy povrchu elektrody.

Získané voltametrické křivky jsou vyobrazeny na Obr. 3.4 (s obnovou elektrodového povrchu), resp. Obr. 3.5 (bez obnovy). Z uvedených dat (Tab. 3.1) vyplývá, že opakovatelnost měření bez obnovy povrchu (s relativní směrodatnou odchylkou 0,6 %) je vynikající, během dvaceti po sobě jdoucích měření došlo pouze k zanedbatelné změně velikosti výšky píku. Při obnově elektrodového povrchu mezi jednotlivými skeny bylo dosaženo nejen nižší průměrné hodnoty výšky píku, ale také více než desetinásobně větší relativní směrodatné odchylky (8,3 %), proto byla pro další měření využita elektroda bez aktivace, tj. bez mechanické či chemické obnovy povrchu.



**Obr. 3.4**

DPV záznamy deseti po sobě jdoucích měření na CPE s mechanickou obnovou povrchu. Měřeno v roztoku carboxinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v prostředí BR pufru o pH 2 s MeOH (90:10, V/V).



**Obr. 3.5**

DPV záznamy dvaceti po sobě jdoucích měření na CPE bez obnovy povrchu. Měřeno v roztoku carboxinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v prostředí BR pufru o pH 2 s MeOH (90:10, V/V).

**Tab. 3.1**

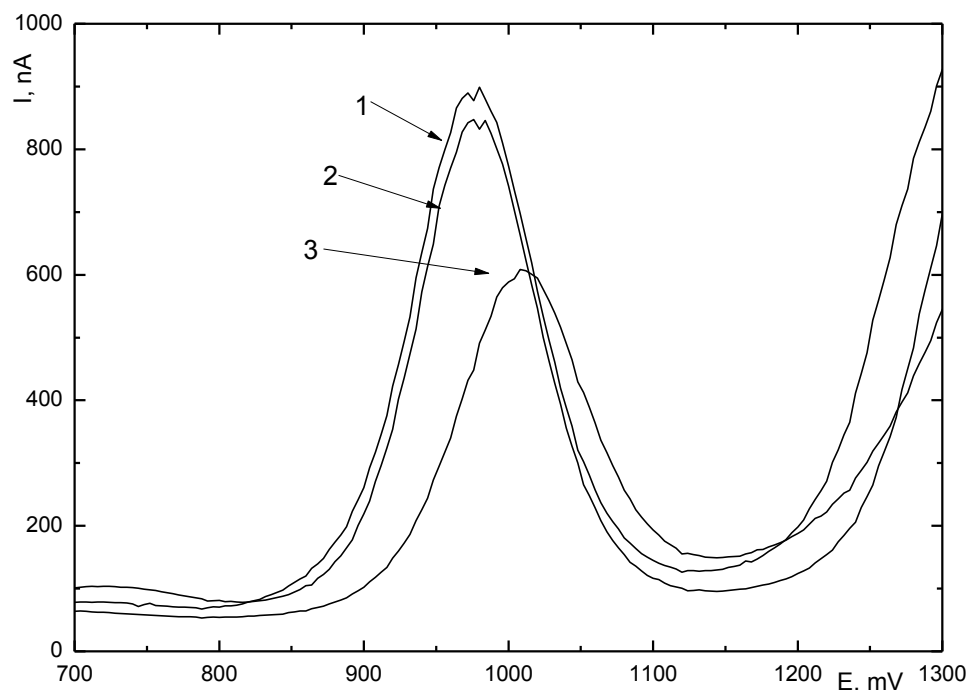
Statistické vyhodnocení opakovatelnosti měření výšky píku carboxinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v prostředí BR pufr o  $\text{pH} = 2$  a MeOH (90:10, V/V). Měřeno metodou DPV na CPE s mechanickou obnovou ( $n = 10$ ), resp. bez obnovy elektrodového povrchu ( $n = 20$ ).

způsob měření	s obnovou povrchu elektrody	bez obnovy povrchu elektrody
výška píku [nA]	726,6	760,9
$s$ [nA]	60,3	4,6
$s_r$ [%]	8,3	0,6

### 3.1.3 Vliv obsahu methanolu na stanovení carboxinu

Faktorem, jehož vliv na stanovení carboxinu metodou DPV je vhodné ověřit, je také podíl methanolu ve stanovovaném roztoku. Pro studium závislosti výšky píku na obsahu methanolu byl použit roztok carboxinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v prostředí BR pufru o  $\text{pH} 2$ ; obsah methanolu byl postupně zvyšován, a to tak, aby vznikl 1, 10 a 50% methanolickeý roztok (V/V).

Získané voltametrické záznamy jsou vykresleny na Obr. 3.6, který ukazuje, že se zvyšujícím se obsahem methanolu klesá výška píku a při jeho velké koncentraci dochází též k mírnému posunu píku směrem k pozitivnějším potenciálům. S přihlédnutím k uvedeným skutečnostem bylo pro měření koncentračních závislostí a stanovení carboxinu v modelových vzorcích použit roztok s obsahem methanolu 1 % (V/V).



**Obr. 3.6**

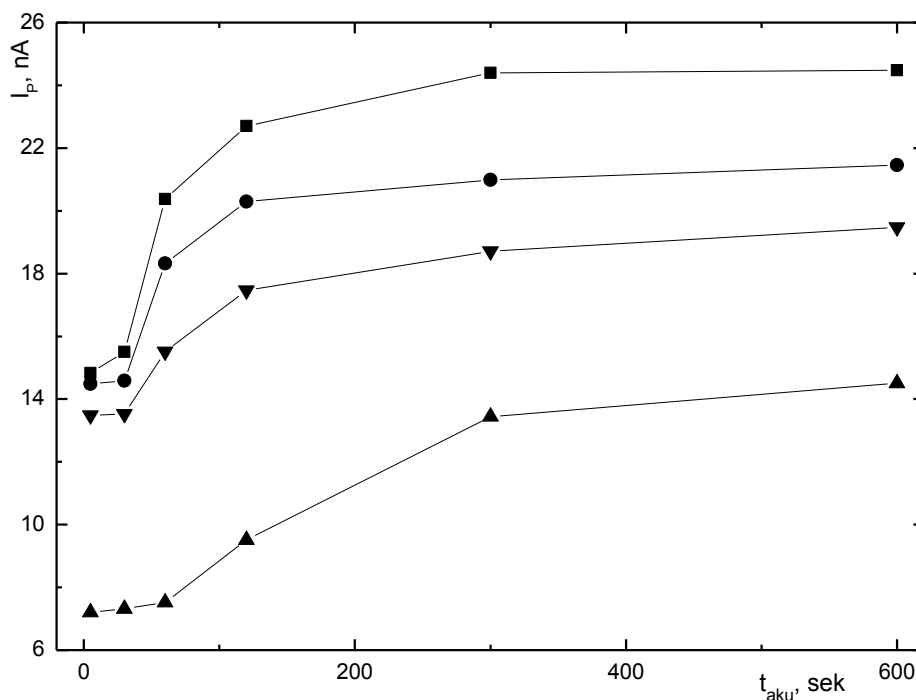
Voltamogramy roztoku carboxinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  měřené při různém obsahu methanolu. Měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 2 s MeOH o obsahu 1 (1), 10 (2) a 50 (3) % (V/V).

### 3.1.4 Vliv akumulace carboxinu na CPE

Dalším možným činitelem, jenž může pozitivně ovlivňovat citlivost stanovení, je adsorpce analytu na povrch pracovní uhlíkové pastové elektrody. Tato možnost byla zkoumána v roztoku carboxinu o koncentraci  $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v prostředí BR pufru s 0, 1, 10 a 50% obsahem methanolu. Pracovní elektroda byla před měřením DP voltamogramu ponořena po dobu 5, 30, 60, 120, 300 a 600 sekund do míchaného roztoku.

Obr. 3.7, který zachycuje závislost výšek píků na době akumulace, ukazuje, že s rostoucím časem akumulace narůstá výška píků, nejvýrazněji mezi 30 a 120 sekundami (pro 0 a 1% methanolický roztok). Největší nárůst signálu při maximálním čase akumulace 600 sekund vykazuje 10% methanolický roztok, a to o 101,4 %. Doba akumulace tak má na velikost signálu carboxinu určitý vliv, avšak k adsorpci carboxinu na povrch uhlíkové pastové elektrody dochází vzhledem k potřebám stanovení pouze nedostatečně. Míra akumulace tak není s ohledem na prodloužení doby analýzy uspokojivá a pro další měření tedy nebyla využita.





**Obr. 3.7**

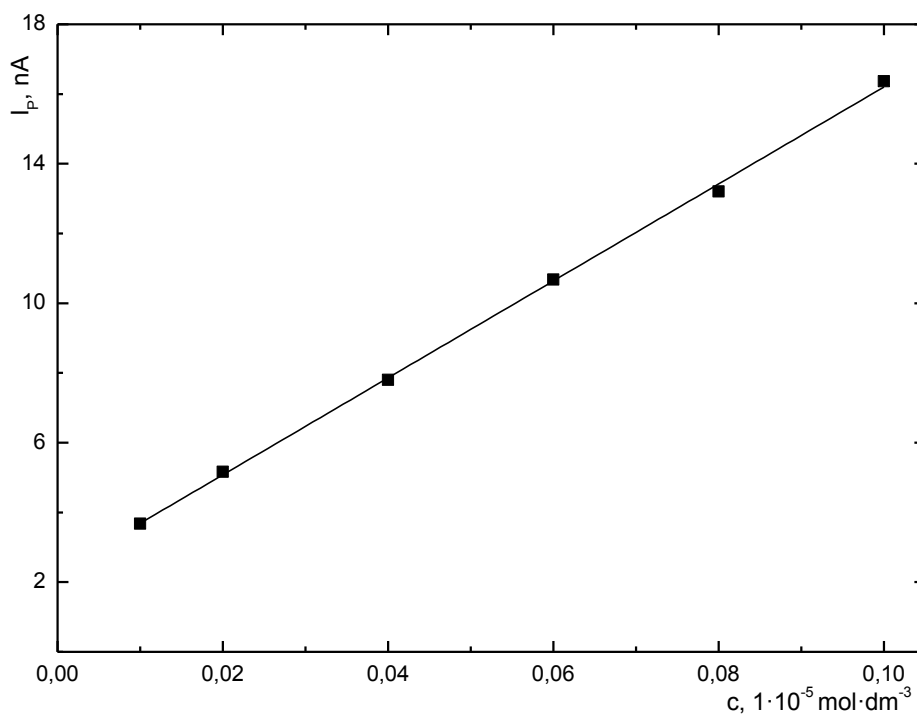
Závislost výšek píků na době akumulace (5, 30, 60, 120, 300 a 600 sekund). Měřeno v roztoku carboxinu o koncentraci  $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v prostředí BR pufru o pH 2 s MeOH o obsahu 0 (■), 1 (●), 10 (▼) a 50 (▲) % (V/V). Měřeno metodou DPV na CPE.

### 3.1.5 Kalibrační závislosti

Kalibrační závislosti roztoku carboxinu byly proměřeny při stanovených optimálních podmínkách, a to v rozmezí  $1 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v prostředí BR pufru o pH 2 a methanolu v poměru 99:1 (V/V). Naměřené křivky byly zpracovány metodou lineární regrese. Hodnoty proudů píků byly brány jako průměrná hodnota ze tří po sobě jdoucích měření.

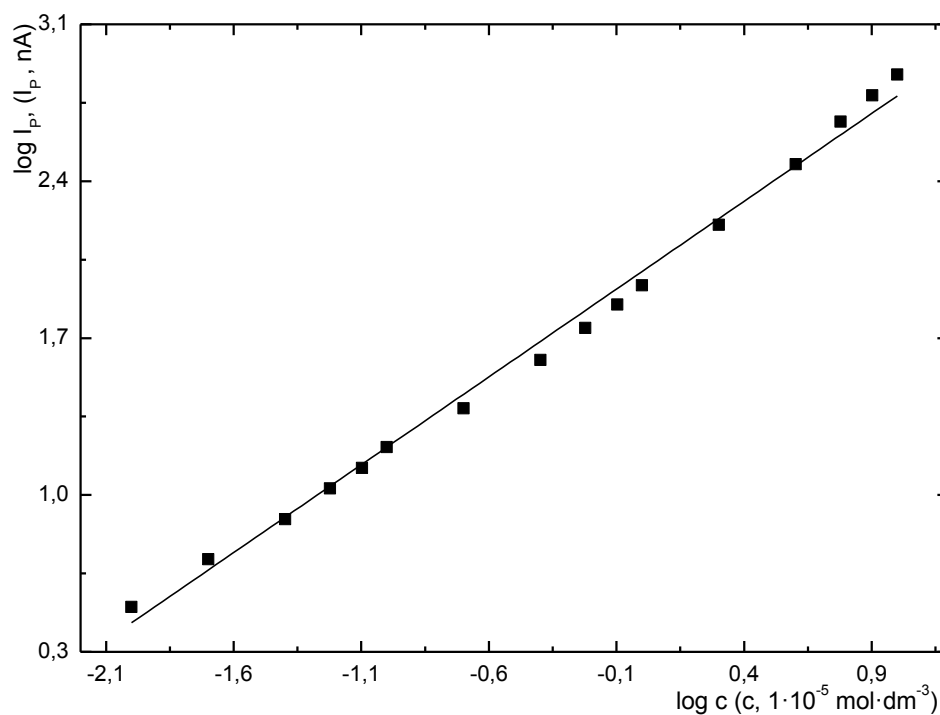
Na Obr. 3.8 je uvedena kalibrační přímka nejnižšího koncentračního řádu, logaritmické forma kalibrační přímky v celém koncentračním rozmezí je znázorněna na Obr. 3.9. Vybrané záznamy stanovení carboxinu metodou DPV na CPE, a to v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  zobrazuje Obr. 3.10.

Parametry získaných kalibračních závislostí jsou shrnuty v Tab. 3.2. Korelační koeficienty se pohybují v rozsahu 0,9996 až 0,9999, což by odpovídalo lineární závislosti, avšak směrnice logaritmické formy kalibrační křivky, stejně jako směrnice jednotlivých koncentračních řádů naznačují odchýlení od přímkového průběhu u nejnižších koncentrací. Dosažený limit detekce byl  $1,1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .



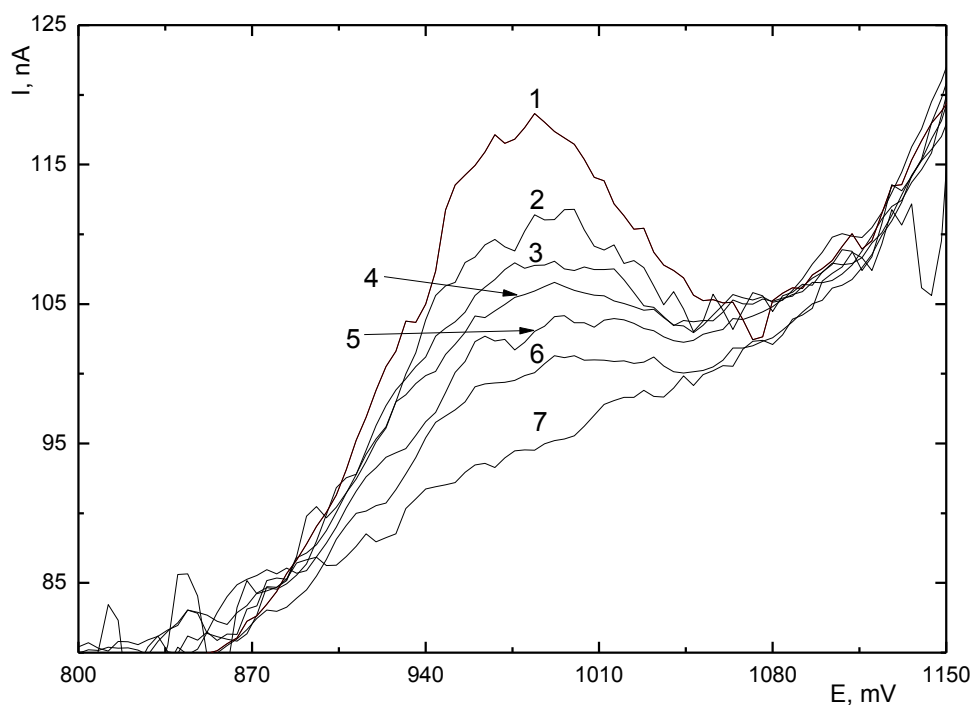
**Obr. 3.8**

Kalibrační závislost carboxinu v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 2 a methanolu (99:1, V/V).



**Obr. 3.9**

Logaritmická forma kalibrační závislosti carboxinu v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 2 a 1% MeOH (V/V).



**Obr. 3.10**

Voltamogramy roztoku carboxinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-6}$  (1),  $8 \cdot 10^{-7}$  (2),  $6 \cdot 10^{-7}$  (3),  $4 \cdot 10^{-7}$  (4),  $2 \cdot 10^{-7}$  (5),  $1 \cdot 10^{-7}$  (6)  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a základní elektrolyt (7). Měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 2 a methanolu (99:1, V/V).

**Tab. 3.2**

Parametry kalibračních závislostí carboxinu. Měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 2 s methanolem (99:1, V/V).

$c$ ( $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ )	směrnice ( $\text{mA} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$ )	úsek (nA)	$R$	$L_D$ ( $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ )
$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	7,43	10,2	0,9998	-
$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	7,74	8,8	0,9999	-
$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6}$	13,91	2,3	0,9996	-
$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	7,47	7,8	0,9998	$1,1 \cdot 10^{-7}$

Parametry logaritmické závislosti:  $\log I = a \log c + b$ ;  $a = 0,82$  ;  $b = 1,89$ ;  $R = 0,9974$

### 3.1.6 Modelové vzorky

Využitelnost nově vyvinuté voltametrické metody stanovení carboxinu na CPE byla ověřena na dvou modelových vzorcích, a to na vzorcích pitné a říční vody.

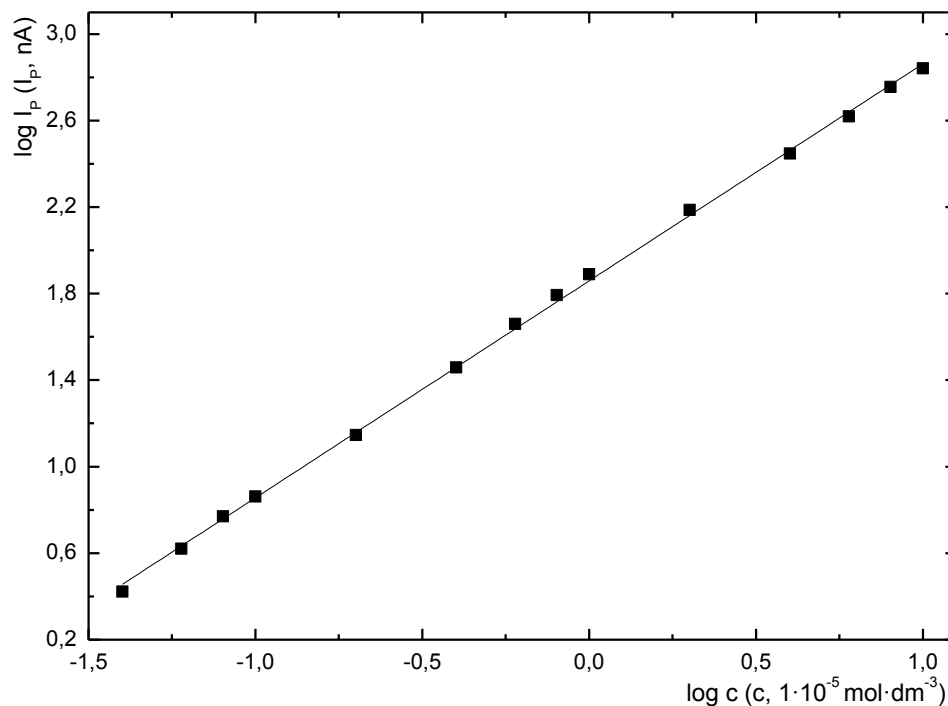
#### *Stanovení carboxinu v pitné vodě*

První matricí, na kterou byla přenesena vyvinutá metoda stanovení carboxinu, byla pitná voda. Vzorek byl odebrán z vodovodu laboratoře č. 112, PřF UK, Hlavova 8, Praha 2. Voda byla odebrána po minutovém odtočení, aby došlo k odstranění případných nečistot. Vzorek pitné vody byl dále smísen s přesným množstvím zásobního roztoku o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Modelové vzorky pitné vody byly připravovány bezprostředně před měřením, a to odpipetováním potřebného množství pitné vody s přidavkem analytu, 5 ml BR pufru o pH 2, takového množství MeOH, aby obsah odpovídal 1% (V/V) a doplněním pitnou vodou na objem 10 ml. Uváděné hodnoty koncentrací jsou vztaženy k takto připraveným roztokům.

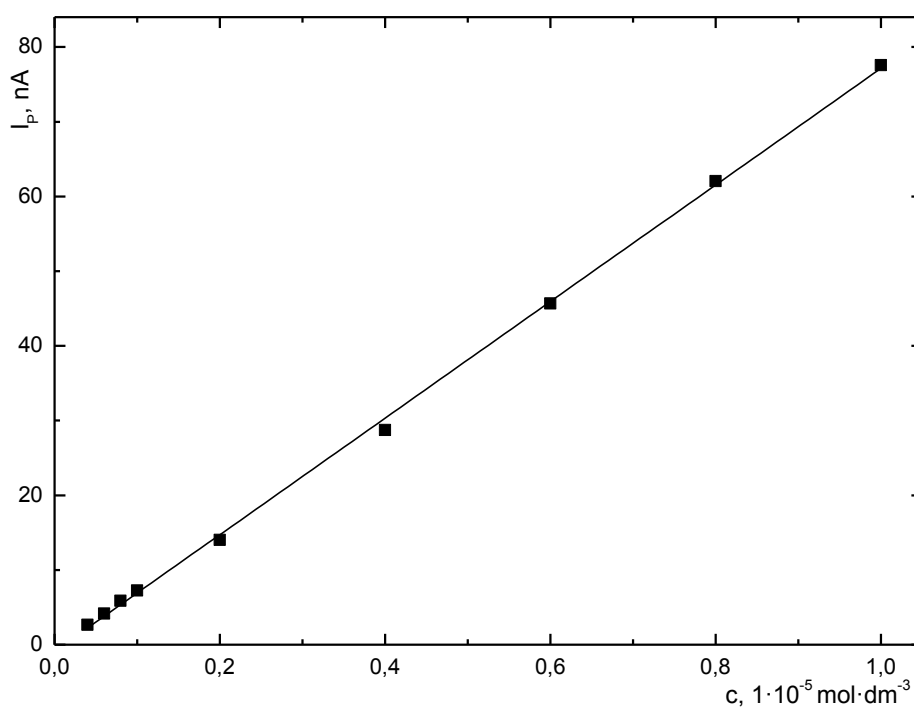
Koncentrační závislosti byly naměřeny v rozsahu  $4 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Logaritmická forma této závislosti je ukázána na Obr. 3.11, poslední dva koncentrační řády jsou pak na Obr. 3.12. Obr. 3.13 ukazuje vybrané záznamy v rozmezí koncentrací  $4 \cdot 10^{-7}$  až  $4 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Parametry kalibračních přímků uvedených v Tab. 3.3 dokazují, že naměřené kalibrační závislosti jsou lineární v celém měřeném koncentračním rozmezí, tento fakt pak dokazuje směrnice logaritmické závislosti, jejíž hodnota se rovná jedné. Dosažená mez detekce byla  $3,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Směrnice kalibračních přímků získaných při stanovení carboxinu v modelovém vzorku pitné vody byly obdobné jako hodnoty ve vodě deionizované, avšak mez detekce v modelovém vzorku byla oproti deionizované vodě nepatrně vyšší.



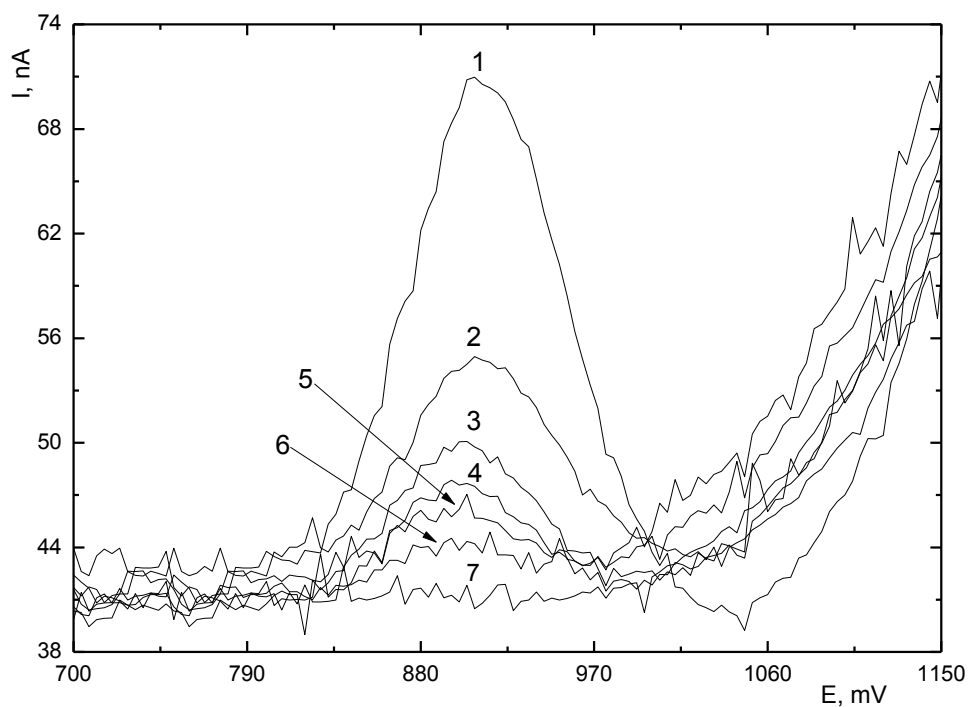
**Obr. 3.11**

Logaritmická forma kalibrační závislosti carboxinu v modelovém vzorku pitné vody v koncentračním rozmezí  $6 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 2 a 1% MeOH (V/V).



**Obr. 3.12**

Kalibrační závislost carboxinu v modelovém vzorku pitné vody v koncentračním rozmezí  $4 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 2 a 1% MeOH (V/V).



**Obr. 3.13**

Voltamogramy roztoku carboxinu o koncentraci  $4 \cdot 10^{-6}$  (1),  $2 \cdot 10^{-6}$  (2),  $1 \cdot 10^{-6}$  (3),  $8 \cdot 10^{-7}$  (4),  $6 \cdot 10^{-7}$  (5),  $4 \cdot 10^{-7}$  (6)  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a základní elektrolyt (7). Měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 2 a 1% MeOH (V/V).

**Tab. 3.3**

Parametry kalibračních závislostí carboxinu v pitné vodě. Měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 2 a 1% MeOH (V/V).

$c$ ( $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ )	směrnice ( $\text{mA} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$ )	úsek (nA)	$R$	$L_D$ ( $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ )
$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	6,87	10,2	0,9996	-
$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	7,90	-1,6	0,9996	-
$4 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6}$	7,79	-0,5	0,9992	-
$4 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	6,97	2,9	0,9997	$3,2 \cdot 10^{-7}$

Parametry logaritmické závislosti:  $\log I = a \log c + b$ ;  $a = 1,00$ ;  $b = 1,86$ ;  $R = 0,9997$

### ***Stanovení carboxinu v říční vodě***

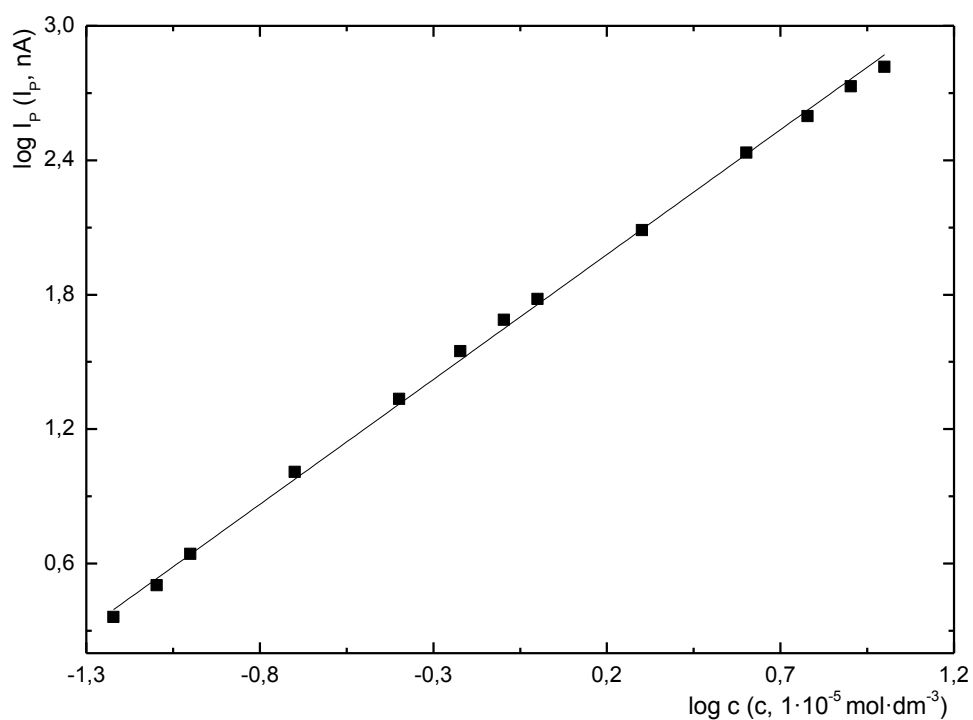
Po úspěšném stanovení carboxinu metodou DPV na CPE v modelovém vzorku pitné vody byla jako další matrice použita voda říční, konkrétně voda vltavská. Vzorek říční vody byl odebrán v Praze poblíž tramvajové zastávky Podolská vodárna. Před dalším využitím byla říční voda přefiltrována a následně smísena s přesným množstvím zásobního roztoku carboxinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Modelové vzorky carboxinu v říční vodě byly připraveny v den měření; k přesnému objemu říční vody s přidavkem analytu bylo odpipetováno 5 ml BR pufru o pH 2, dále takové množství MeOH, aby obsah odpovídal 1% (V/V) a doplněno říční vodou na objem 10 ml. Uváděné hodnoty koncentrací jsou vztaženy k takto připraveným roztokům.

Koncentrační závislosti byly naměřeny v rozsahu  $6 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Parametry kalibračních přímek jsou uvedeny v Tab. 3.4. Mez detekce dosáhla hodnoty  $6,1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

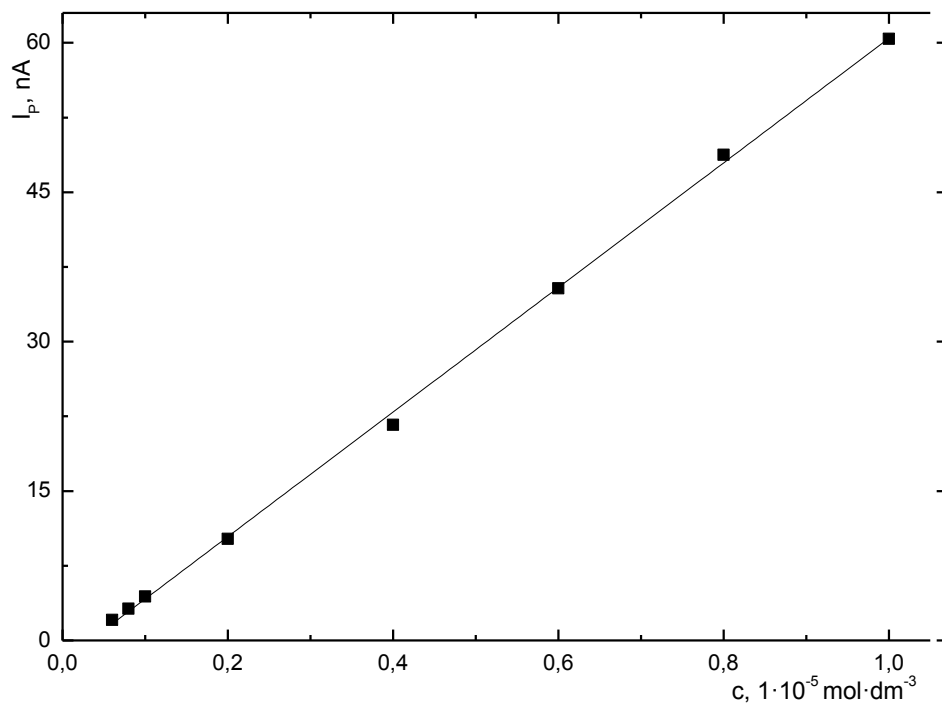
Logaritmická forma kalibrační přímky v celém koncentračním rozsahu je znázorněna na Obr. 3.14, kalibrační přímka posledních dvou naměřených koncentračních řádů pak na Obr. 3.15. Obr. 3.16 zobrazuje reálné voltametrické křivky carboxinu v říční vodě v koncentračním rozmezí  $6 \cdot 10^{-7}$  až  $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Parametry kalibračních závislostí jsou obdobné, jako je tomu o vody pitné. Linearitu kalibračních závislostí v celém koncentračním rozsahu potvrzují jak hodnoty korelačních koeficientů, které se pohybují v rozsahu od 0,9995 do 0,9997, tak směrnice logaritmické závislosti, která se blíží jedné. Dosažená mez detekce ( $6,1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) je v porovnání s pitnou vodou ( $3,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) nepatrně vyšší; tato skutečnost mohla být způsobena složitější matricí říční vody, která mohla obsahovat také jiné interferující látky.



**Obr. 3.14**

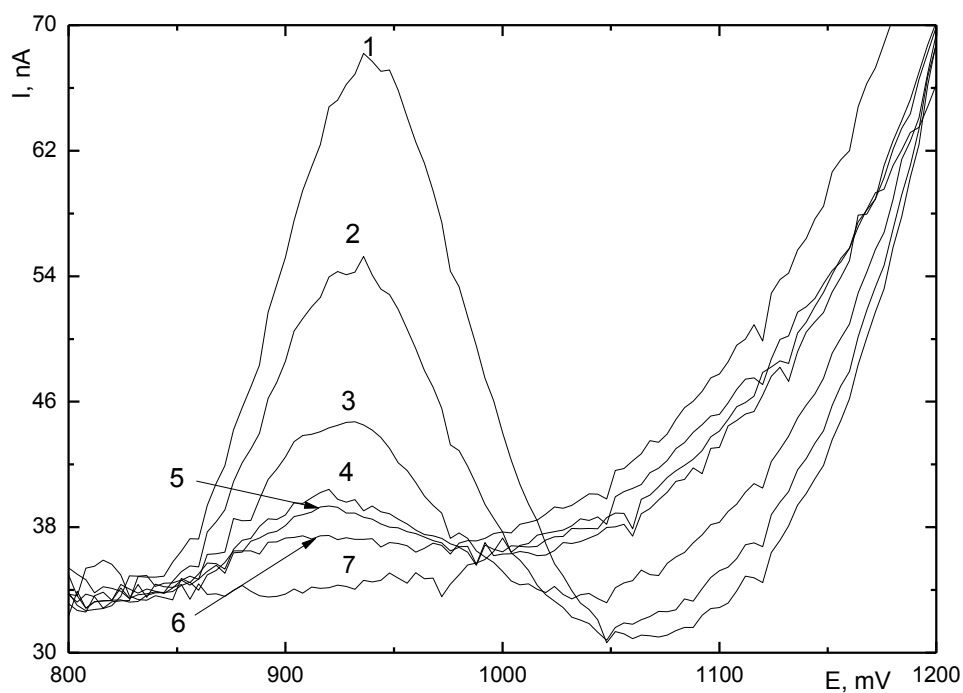
Logaritmická forma kalibrační závislosti carboxinu v modelovém vzorku říční vody v koncentračním rozmezí  $6 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 2 a 1% MeOH (V/V).



**Obr. 3.15**

Kalibrační závislost carboxinu v modelovém vzorku říční vody v koncentračním rozmezí  $6 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 2 a 1% MeOH (V/V).





**Obr. 3.16**

Voltamogramy roztoku carboxinu o koncentraci  $6 \cdot 10^{-6}$  (1),  $4 \cdot 10^{-6}$  (2),  $2 \cdot 10^{-6}$  (3),  $1 \cdot 10^{-6}$  (4),  $8 \cdot 10^{-7}$  (5),  $6 \cdot 10^{-7}$  (6)  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a základní elektrolyt (7). Měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 2 a 1% MeOH (V/V).

**Tab. 3.4**

Parametry kalibračních závislostí carboxinu v říční vodě. Měřeno metodou DPV na CPE v prostředí BR pufru o pH 2 a 1% MeOH (V/V).

$c$ ( $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ )	směrnice ( $\text{mA} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$ )	úsek (nA)	$R$	$L_D$ ( $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ )
$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	6,59	3,2	0,9995	-
$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	6,31	-2,5	0,9995	-
$6 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6}$	5,80	-1,4	0,9996	-
$6 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	6,66	-2,0	0,9997	$6,1 \cdot 10^{-7}$

Parametry logaritmické závislosti:  $\log I = a \log c + b$ ;  $a = 1,10$ ;  $b = 1,76$ ;  $R = 0,9988$

## 3.2 Voltametrické stanovení carboxinu na mCPE

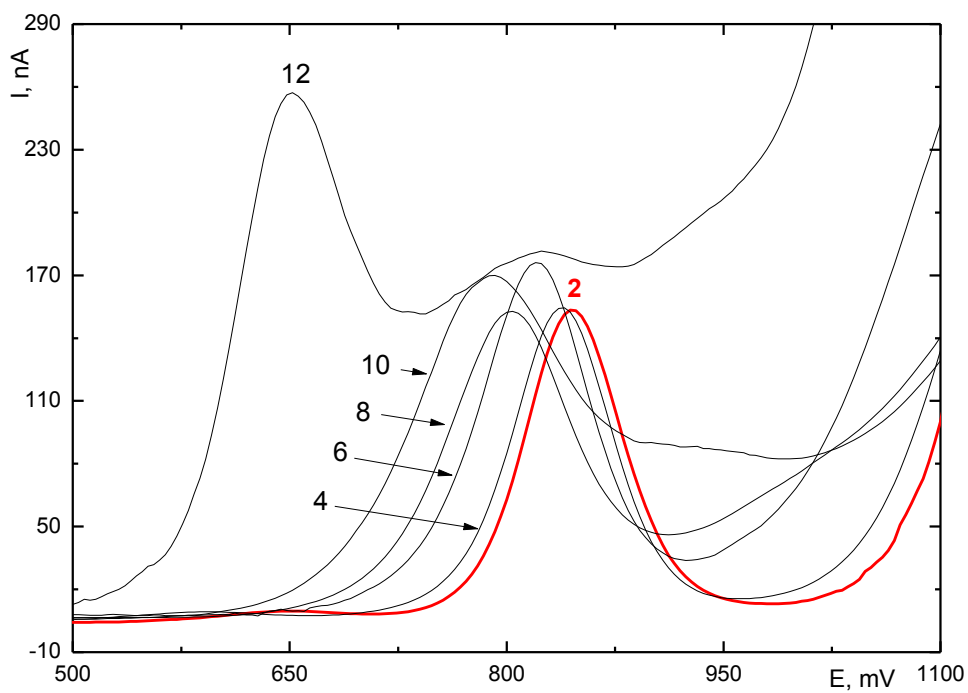
V době neustálého vývoje nových metod je kladen důraz také na vývoj miniaturizovaných systémů, nízkou spotřebu činidel a využitelnost těchto systémů v terénních podmínkách.

V této části diplomové práce byl sestrojen miniaturizovaný systém elektrod a jeho použití bylo ověřeno na stanovení carboxinu v objemu 1 ml.

### 3.2.1 Vliv pH na stanovení carboxinu

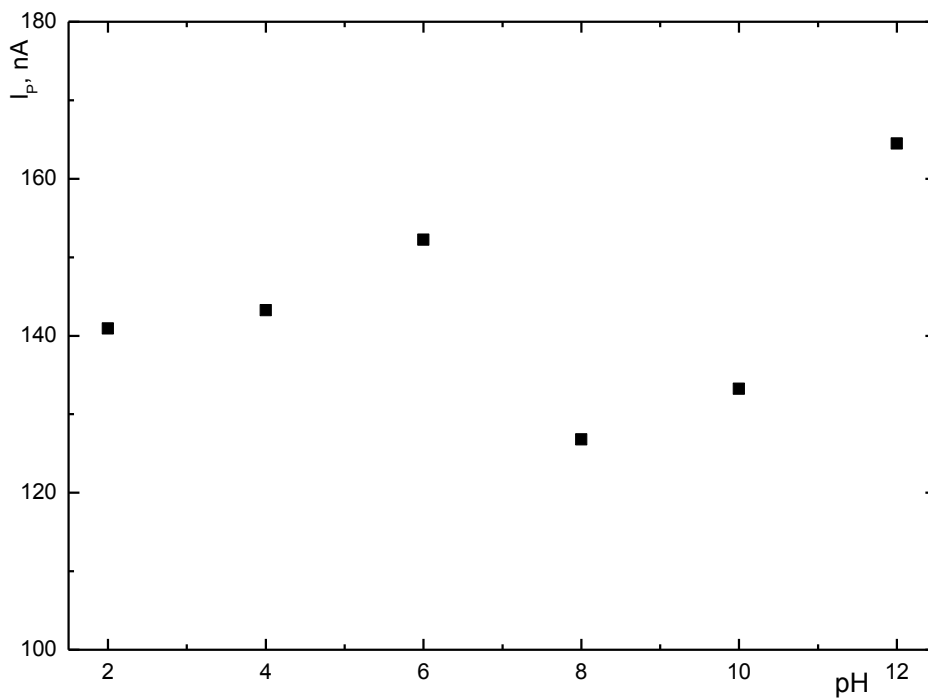
Pro nalezení optimální hodnoty pH BR pufru pro stanovení carboxinu metodou DPV s využitím miniaturizované uhlíkové pastové elektrody byl použit roztok carboxinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v prostředí BR pufru v rozmezí pH 2 až 12 a methanolu v poměru 99:1 (V/V). Voltametrické křivky byly proměřeny v rozmezí od 0 do +1400 mV.

Z naměřených voltametrických křivek, které jsou znázorněny na Obr. 3.17, je patrné, že při použití mCPE bylo vykazováno obdobné chování jako při použití CPE konvenční, tj. výška píku se změnou pH nemá lineární charakter (Obr. 3.18); s ohledem na tvar píku bylo jako optimální zvoleno prostředí o pH 2, kdy je pík stejně jako v případě konvenční CPE nejlépe vykreslený a vyhodnotitelný. Na Obr. 3.19 pak lze pozorovat posun píků po ose potenciálu se zvyšujícím se pH směrem k nižším potenciálům obdobně jako u CPE konvenční.



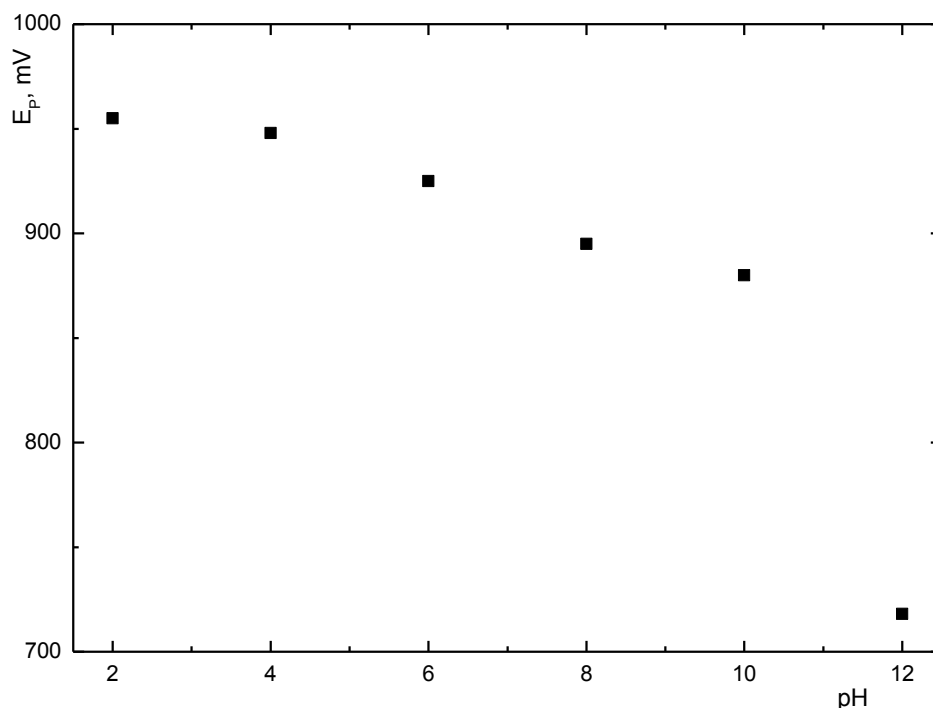
**Obr. 3.17**

Voltamogramy roztoku carboxinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v prostředí BR pufru a methanolu (99:1, V/V) naměřené při pH 2 až 12 (pH naznačeno u křivky). Měřeno metodou DPV na mCPE.



**Obr. 3.18**

Závislost proudu píku carboxinu ( $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) na pH prostředí. Měřeno metodou DPV na mCPE v prostředí BR pufru s methanolem (99:1, V/V).



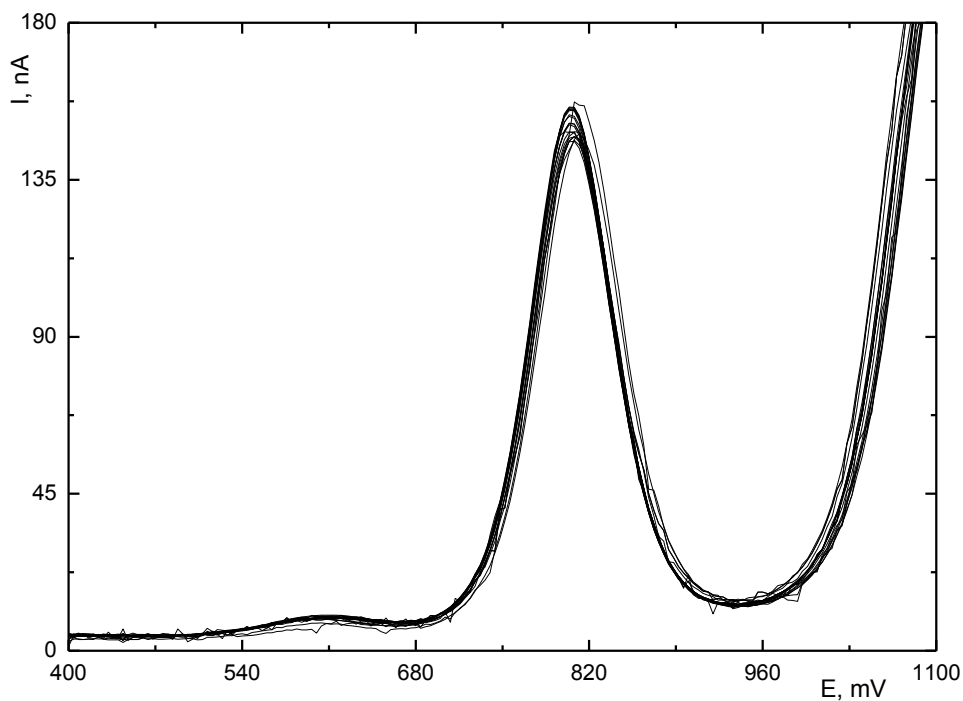
**Obr. 3.19**

Závislost potenciálu píku carboxinu ( $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) na pH prostředí. Měřeno metodou DPV na mCPE v prostředí BR pufru s methanolem (99:1, V/V).

### 3.2.2 Opakovatelnost měření

Opakovatelnost měření na mCPE byla provedena za nalezených optimálních podmínek v roztoku carboxinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  ve směsi BR pufr o pH 2 s methanolem v poměru 99:1 (V/V), a to dvacetinásobným proměřením. Pro zajištění transportu analytu k povrchu elektrody byl roztok carboxinu mezi jednotlivými měřeními vždy 5 sekund míchán. Z důvodu předpokládaného analogického chování s konvenční uhlíkovou pastovou elektrodou nebyl povrch elektrody mezi jednotlivými skeny obnovován.

Výsledné voltametrické křivky (Obr. 3.20) dokazují předpokládaný fakt, a sice že opakovatelnost měření na mCPE bez obnovy povrchu je stejně jako při použití CPE výborná, během dvaceti po sobě jdoucích měření nedošlo k žádné výrazné změně výšky píku (Tab. 3.5). Relativní směrodatná odchylka je v tomto případě 2,6 %, což je v porovnání s CPE (0,6 %) sice nepatrně vyšší, avšak měření jsou stále opakovatelná. Pro následující práci byla tedy využita mCPE bez obnovy povrchu.



**Obr. 3.20**

DPV záznamy dvaceti po sobě jdoucích měření na mCPE bez obnovy povrchu. Měřeno v roztoku carboxinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v prostředí BR pufru o pH 2 s MeOH (99:1, V/V).

**Tab. 3.5**

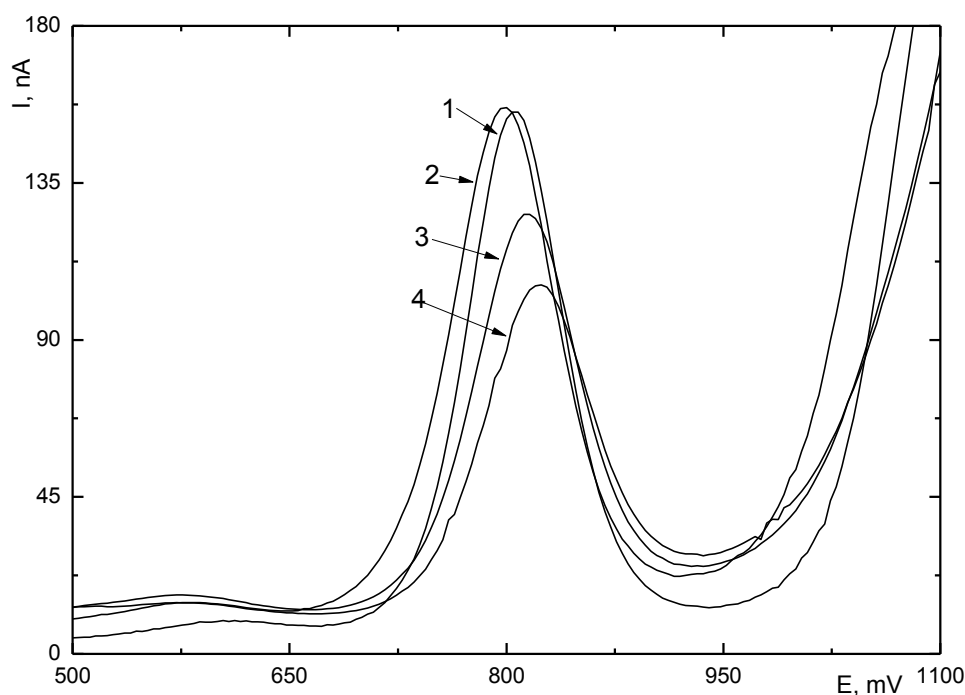
Statistické vyhodnocení opakovatelnosti měření výšky píku carboxinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v prostředí BR pufr o pH = 2 a MeOH (99:1, V/V). Měřeno metodou DPV na mCPE bez obnovy elektrodového povrchu ( $n = 20$ ).

výška píku [nA]	140,1
$s$ [nA]	3,6
$s_r$ [%]	2,6

### 3.2.3 Vliv obsahu methanolu na stanovení carboxinu

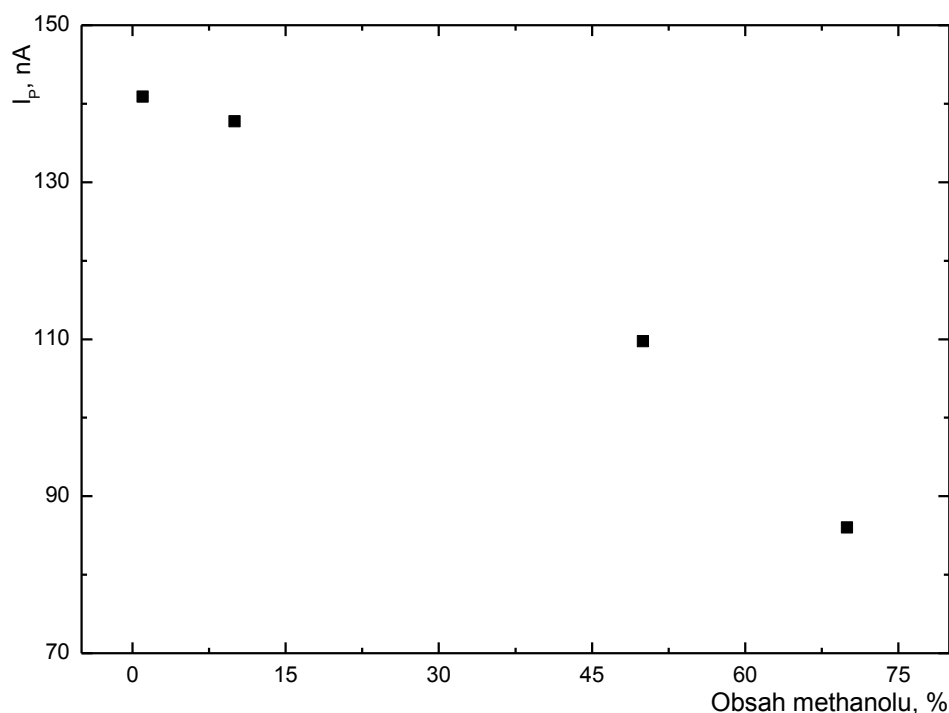
Závislost výšky píku na obsahu methanolu ve stanovovaném roztoku byla ověřena také pro použití mCPE. Pro uvedené studium byl použit roztok carboxinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v prostředí BR pufru o pH 2; obsah methanolu byl postupně zvyšován tak, aby vznikl 1, 10, 50 a 70% methanolický roztok (V/V).

Získané voltametrické záznamy jsou zobrazeny na Obr. 3.21, grafická závislost výšky píku na obsahu methanolu v roztoku pak na Obr. 3.22. Z uvedených obrázků tak zřetelně vyplývá, že se zvyšujícím se obsahem methanolu klesá výška píku, při vysoké koncentraci také k patrnému posunu píku směrem k pozitivnějším potenciálům, což je ve shodě v elektrodou konvenční. Pro měření kalibračních závislostí a stanovení carboxinu v modelovém vzorku pitné a říční vody byl tedy použit roztok carboxinu s 1% obsahem methanolu (V/V).



**Obr. 3.21**

Voltamogramy roztoku carboxinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  měřené při různém obsahu methanolu. Měřeno metodou DPV na mCPE v prostředí BR pufru o pH 2 s MeOH o obsahu 1 (1), 10 (2), 50 (3) a 70 % (V/V).



**Obr. 3.22**

Závislost výšky píku carboxinu ( $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) na obsahu methanolu. Měřeno metodou DPV na mCPE v prostředí BR pufru s methanolem v poměru 1, 10, 50 a 70 % (V/V).

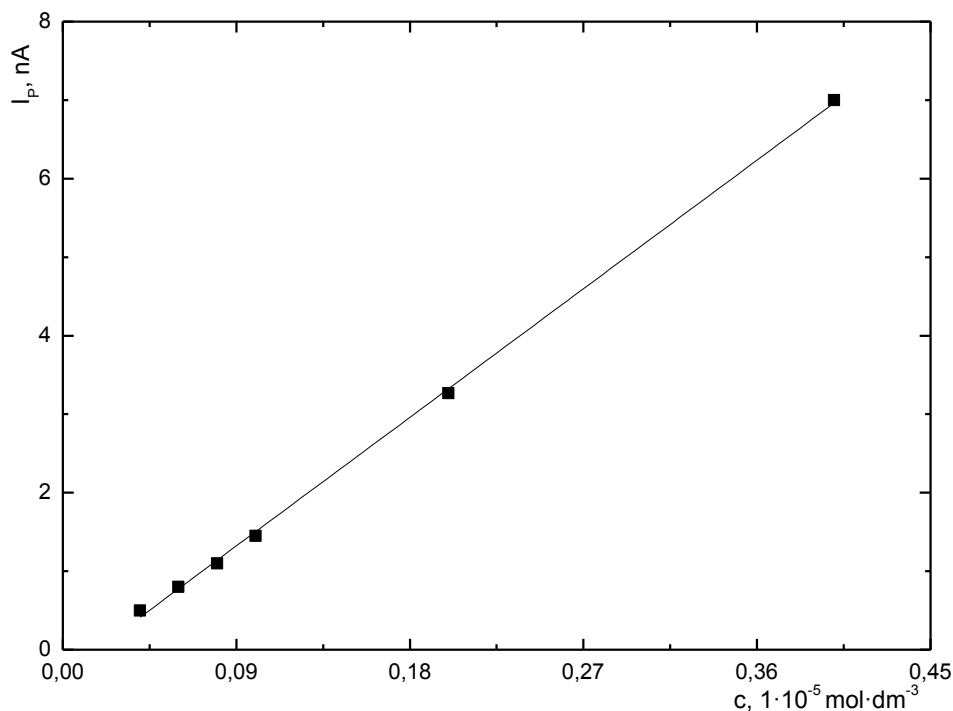
### 3.2.4 Kalibrační závislosti

Kalibrační závislosti roztoku carboxinu s využitím miniaturizované uhlíkové pastové elektrody byly proměřeny při nalezených optimálních podmínkách, tj. v prostředí BR pufru o pH 2 a methanolu v poměru 99:1 (V/V) v rozmezí  $4 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Objem analyzovaného roztoku byl 1 ml. V průběhu měření nebyl obnovován povrch pracovní elektrody. Naměřené křivky byly zpracovány metodou lineární regrese, hodnoty proudů píků byly vypočítány jako průměrná hodnota tří po sobě jdoucích měření.

Kalibrační přímka v rozmezí  $4 \cdot 10^{-7}$  až  $4 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  je uvedena na Obr. 3.23, Obr. 3.24 pak znázorňuje logaritmickou formu kalibrační přímky v celém koncentračním rozmezí. Reálné záznamy stanovení carboxinu metodou DPV na mCPE v rozmezí  $4 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  jsou na Obr. 3.25.

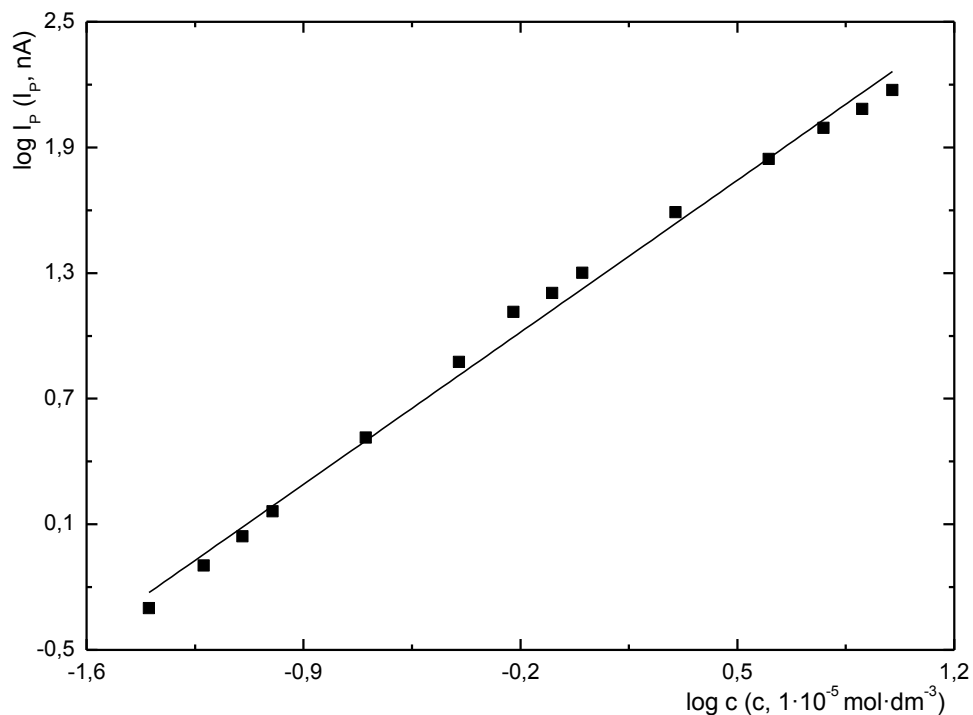
Parametry získaných kalibračních přímek v jednotlivých koncentračních rozmezích jsou uvedeny v Tab. 3.6. Hodnota směrnice logaritmické závislosti, která se blíží jedné, dokazuje linearitu měřené závislosti v celém koncentračním rozmezí. Dosažená mez detekce je  $3,3 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , což je v porovnání s mezí detekce získanou

při použití konvenční CPE ( $1,1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) hodnota nepatrně vyšší. Tato skutečnost mohla být způsobena vyšším šumem při použití miniaturizovaného systému.



**Obr. 3.23**

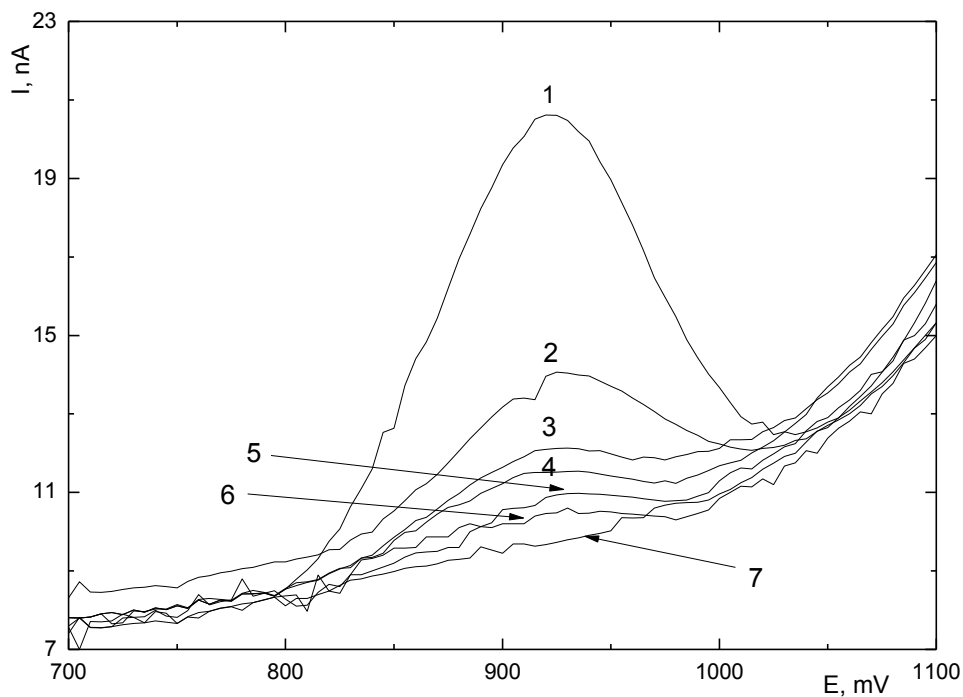
Kalibrační závislost carboxinu v koncentračním rozmezí  $4 \cdot 10^{-7}$  až  $4 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Měřeno metodou DPV na mCPE v prostředí BR pufru o pH 2 a methanolu (99:1, V/V).



**Obr. 3.24**

Logaritmická forma kalibrační závislosti carboxinu v koncentračním rozmezí  $4 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Měřeno metodou DPV na mCPE v prostředí BR pufru o pH 2 a 1% MeOH (V/V).





**Obr. 3.25**

Voltamogramy roztoku carboxinu o koncentraci  $4 \cdot 10^{-6}$  (1),  $2 \cdot 10^{-6}$  (2),  $1 \cdot 10^{-6}$  (3),  $8 \cdot 10^{-7}$  (4),  $6 \cdot 10^{-7}$  (5),  $4 \cdot 10^{-7}$  (6)  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a základní elektrolyt (7). Měřeno metodou DPV na mCPE v prostředí BR pufru o pH 2 a methanolu (99:1, V/V).

**Tab. 3.6**

Parametry kalibračních závislostí carboxinu. Měřeno metodou DPV na mCPE v prostředí BR pufru o pH 2 s methanolem (99:1, V/V).

$c$ ( $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ )	směrnice ( $\text{mA} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$ )	úsek (nA)	$R$	$L_D$ ( $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ )
$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	1,41	10,1	0,9979	-
$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	2,10	-0,6	0,9974	-
$4 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6}$	1,58	-0,1	0,9992	-
$4 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	1,51	2,7	0,9971	$3,3 \cdot 10^{-7}$

Parametry logaritmické závislosti:  $\log I = a \log c + b$ ;  $a = 1,04$ ;  $b = 1,22$ ;  $R = 0,9968$

### 3.2.5 Modelové vzorky

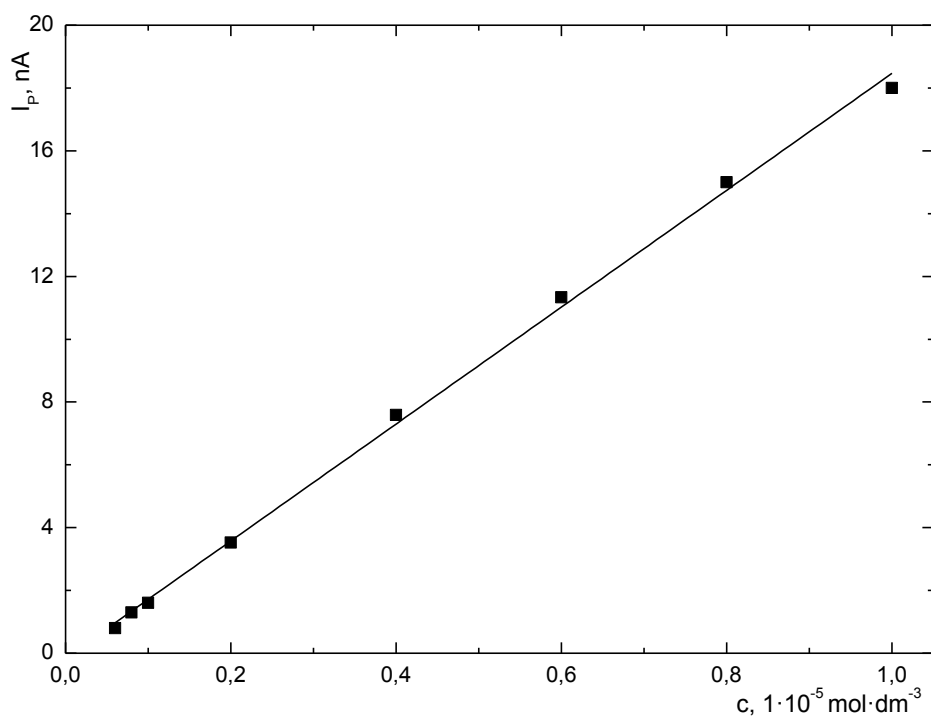
Využitelnost miniaturizovaného systému elektrod pro stanovení carboxinu byla dále ověřena na modelových vzorcích pitné a říční vody.

#### *Stanovení carboxinu v pitné vodě*

Modelové vzorky pitné vody byly zpracovány stejně jako při použití konvenční CPE tak, aby vznikla sada roztoků o koncentraci  $6 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Z takto připravených roztoků byl poté odebrán objem 1 ml určený k dalšímu měření. Všechny roztoky byly připraveny bezprostředně před samotným měřením.

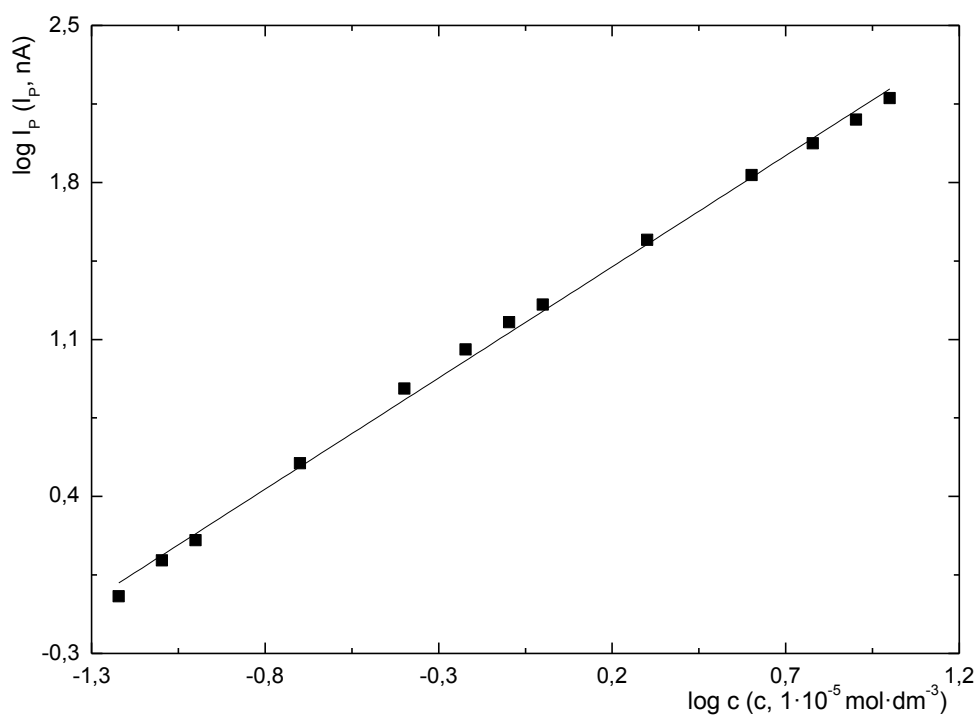
Kalibrační závislost nejnižšího koncentračního řádu ( $6 \cdot 10^{-7}$  až  $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) je uvedena na Obr. 3.26. Kalibrační přímka celé změřené koncentrační oblasti znázorněna v logaritmické formě je na Obr. 3.27. Naměřené voltametrické křivky carboxinu v pitné vodě v koncentračním rozmezí  $6 \cdot 10^{-7}$  až  $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  jsou vykresleny na Obr. 3.28. Parametry kalibračních přímek (Tab. 3.7) jsou srovnatelné s parametry stanovení carboxinu v modelovém vzorku pitné vody za použití konvenční CPE (s ohledem na aktivní průměr pracovní elektrody).

Mez detekce carboxinu v modelovém vzorku pitné vody byla stanovena na  $4,9 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , což je ve srovnání s konvenční CPE stejně jako v případě kalibračních závislostí v deionizované vodě ( $3,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) vyšší hodnota, která byla pravděpodobně způsobena vyšším šumem.



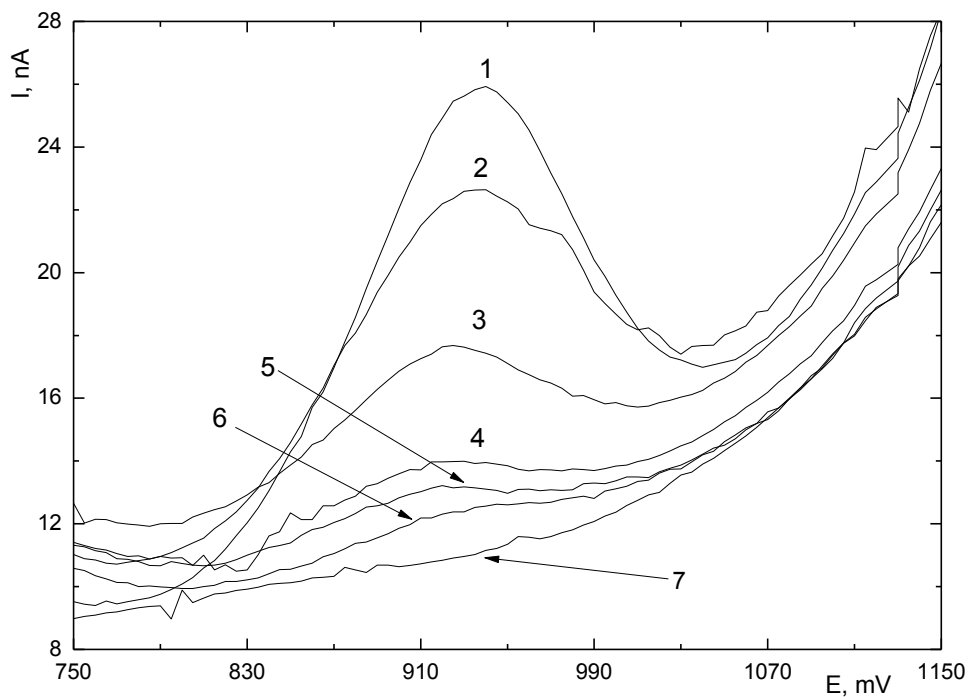
**Obr. 3.26**

Kalibrační závislost carboxinu v modelovém vzorku pitné vody v koncentračním rozmezí  $6 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Měřeno metodou DPV na mCPE v prostředí BR pufru o pH 2 a 1% MeOH (V/V).



**Obr. 3.27**

Logaritmická forma kalibrační závislosti carboxinu v modelovém vzorku pitné vody v koncentračním rozmezí  $6 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Měřeno metodou DPV na mCPE v prostředí BR pufru o pH 2 a 1% MeOH (V/V).



**Obr. 3.28**

Voltamogramy roztoku carboxinu o koncentraci  $6 \cdot 10^{-6}$  (1),  $4 \cdot 10^{-6}$  (2),  $2 \cdot 10^{-6}$  (3),  $1 \cdot 10^{-6}$  (4),  $8 \cdot 10^{-7}$  (5),  $6 \cdot 10^{-7}$  (6)  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a základní elektrolyt (7). Měřeno metodou DPV na mCPE v prostředí BR pufru o pH 2 a 1% MeOH (V/V).

**Tab. 3.7**

Parametry kalibračních závislostí carboxinu v pitné vodě. Měřeno metodou DPV na mCPE v prostředí BR pufru o pH 2 a 1% MeOH (V/V).

$c$ ( $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ )	směrnice ( $\text{mA} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$ )	úsek (nA)	$R$	$L_D$ ( $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ )
$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	1,44	6,3	0,9988	-
$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	1,85	0,0	0,9989	-
$6 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6}$	1,75	-0,1	0,9966	-
$6 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	1,50	2,0	0,9988	$4,9 \cdot 10^{-7}$

Parametry logaritmické závislosti:  $\log I = a \log c + b$ ;  $a = 0,99$ ;  $b = 1,23$ ;  $R = 0,9987$

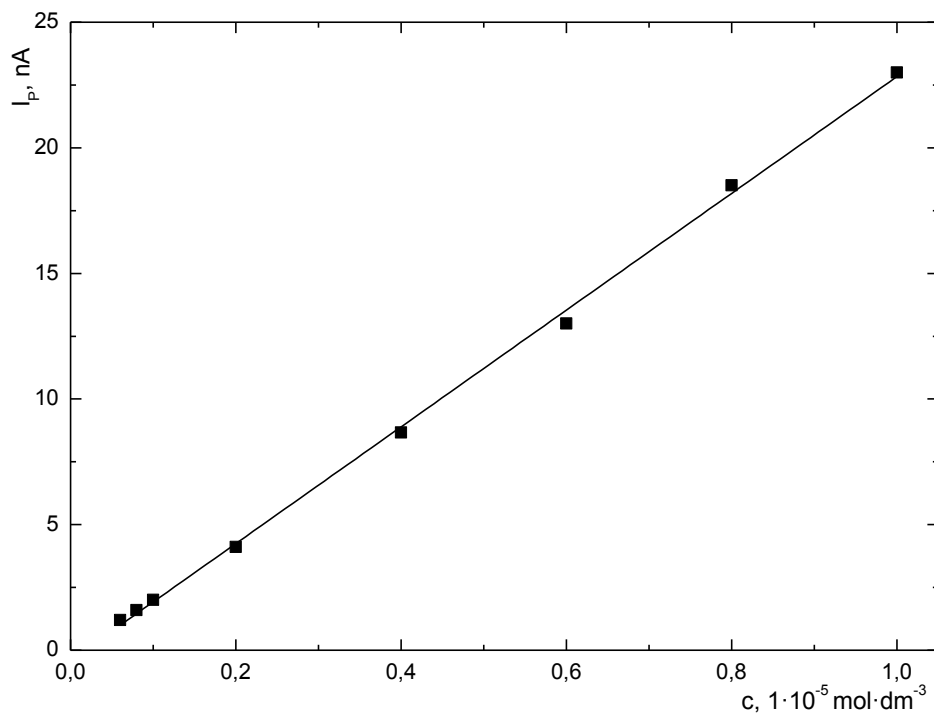
### ***Stanovení carboxinu v říční vodě***

Metodou DPV s využitím mCPE byla dále sledována také koncentrace carboxinu v modelovém vzorku říční vody. Stanovení carboxinu bylo provedeno stejně jako v případě použití elektrody konvenční; bezprostředně před daným měřením byla připravena série roztoků o koncentraci  $6 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , ze kterých byl pro samotné měření použit 1 ml objemu.

Kalibrační přímka posledních dvou změřených koncentračních řádů je na Obr. 3.29, reálné voltametrické křivky stejného koncentračního rozmezí pak na Obr. 3.31. Celý rozsah koncentrací znázorněn kalibrační přímkou v logaritmické formě je na Obr. 3.30.

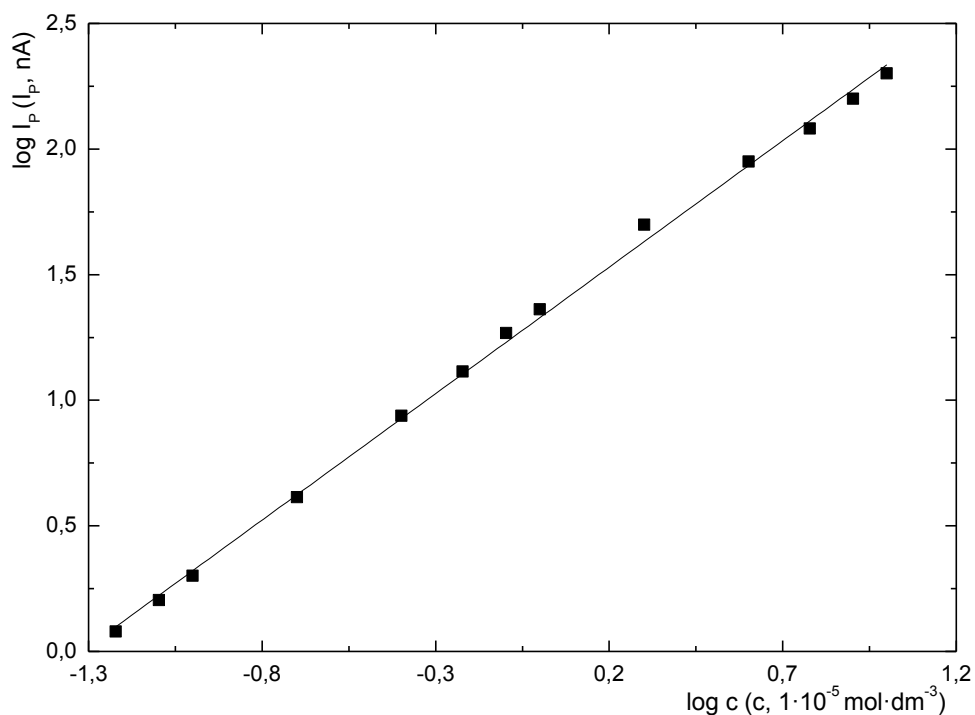
Parametry kalibračních závislostí (Tab. 3.8) jsou s ohledem na aktivní průměr pracovní elektrody srovnatelné s parametry stanovení carboxinu v modelovém vzorku říční vody při využití konvenční CPE. Směrnice logaritmické závislosti, která se rovná jedné, potvrzuje linearitu změřené závislosti v celém koncentračním rozmezí.

Dosažená mez detekce byla stanovena na  $6,4 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , což je hodnota srovnatelná s mezí detekce získanou při použití CPE konvenční ( $6,1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ). V porovnání s hodnotami mezí detekce získanými v deionizované, resp. pitné vodě, je tato hodnota nepatrně vyšší, jedná se tak o analogický trend s elektrodou konvenční.



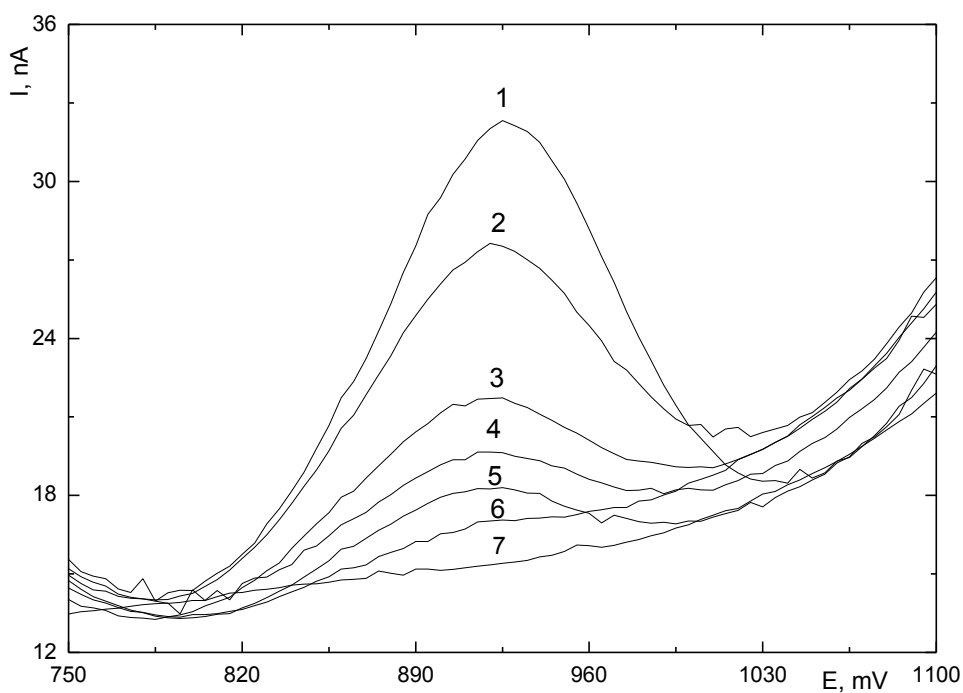
**Obr. 3.29**

Kalibrační závislost carboxinu v modelovém vzorku říční vody v koncentračním rozmezí  $6 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Měřeno metodou DPV na mCPE v prostředí BR pufru o pH 2 a 1% MeOH (V/V).



**Obr. 3.30**

Logaritmická forma kalibrační závislosti carboxinu v modelovém vzorku říční vody v koncentračním rozmezí  $6 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Měřeno metodou DPV na mCPE v prostředí BR pufru o pH 2 a 1% MeOH (V/V).



**Obr. 3.31**

Voltamogramy roztoku carboxinu o koncentraci  $6 \cdot 10^{-6}$  (1),  $4 \cdot 10^{-6}$  (2),  $2 \cdot 10^{-6}$  (3),  $1 \cdot 10^{-6}$  (4),  $8 \cdot 10^{-7}$  (5),  $6 \cdot 10^{-7}$  (6)  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a základní elektrolyt (7). Měřeno metodou DPV na mCPE v prostředí BR pufru o pH 2 a 1% MeOH (V/V).

**Tab. 3.8**

Parametry kalibračních závislostí carboxinu v říční vodě. Měřeno metodou DPV na mCPE v prostředí BR pufru o pH 2 a 1% MeOH (V/V).

$c$ ( $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ )	směrnice ( $\text{mA} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$ )	úsek (nA)	$R$	$L_D$ ( $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ )
$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	1,90	8,5	0,9985	-
$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	2,35	-0,6	0,9993	-
$6 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6}$	2,00	0,0	1,0000	-
$6 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	1,99	2,2	0,9986	$6,4 \cdot 10^{-7}$

Parametry logaritmické závislosti:  $\log I = a \log c + b$ ;  $a = 1,00$ ;  $b = 1,33$ ;  $R = 0,9991$

### 3.3 Stanovení carboxinu pomocí HPLC se spektrofotometrickou a elektrochemickou detekcí

Stanovovaný analyt, carboxin, se v reálných vzorcích často nevyskytuje sám, ale s celou řadou rozmanitých látek, které značně ovlivňují a komplikují jeho stanovení, k němuž pak nelze vzhledem k jejich nedostatečné selektivitě využít klasických voltametrických technik. Pro separaci carboxinu z těchto složitých matric je možné využít vysokoúčinné kapalinové chromatografie, a to v kombinaci s elektrochemickou a spektrofotometrickou detekcí.

#### 3.3.1 Optimalizace podmínek měření

Pro optimalizaci stanovení carboxinu metodou HPLC se spektrofotometrickou a elektrochemickou detekcí je důležité nalezení podmínek, při kterých je pík nejvyšší, resp. nejlépe vyhodnotitelný. Při optimalizaci bylo zvažováno pH a obsah organického modifikátoru v mobilní fázi a potenciál pracovní elektrody. Elektrochemický detektor typu wall-jet byl zapojen sériově za detektor spektrofotometrický.

Pro proměření optimálních podmínek byl použit roztok carboxinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  ve směsi methanol s vodou v poměru 50:50 (V/V). Pro UV detekci byla na základě UV-VIS spektra zvolena vlnová délka 251 nm.

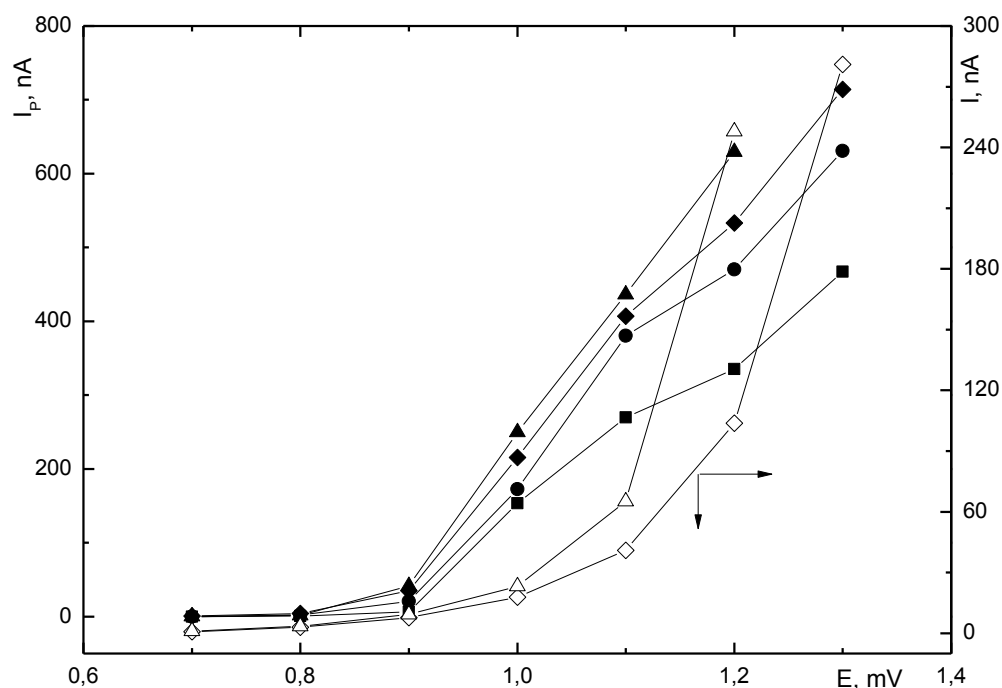
Počáteční podíl methanolu jako organického modifikátoru byl zvolen na základě předchozích zkušeností s analogickými látkami na 60 % (V/V). Poloha píku nezávisela v použitém rozmezí podmínek na pH a zvolený poměr methanolu zaručoval dostatečné oddělení píku látky od píku matrice při současném zachování dostatečně nízkého času analýzy. Proto byl tento podíl methanolu nadále zachován.

Vliv potenciálu pracovní elektrody byl vyhodnocen z výšek píků. Měření bylo provedeno s ohledem na pracovní rozsah kolony pro pH vodné složky mobilní fáze 2,5, 4,5, 5,5 a 6,5. Proměřeny byly hodnoty potenciálu pracovní elektrody v rozmezí +0,7 až +1,3 V, dávkováno bylo 20  $\mu\text{l}$  roztoku carboxinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  ve směsi methanol:H<sub>2</sub>O = 50:50 (V/V) s průtokovou rychlostí 1 ml.min<sup>-1</sup>.

Získané hydrodynamické voltamogramy, tedy závislost výšky píku na potenciálu vkládaném na elektrodu, jsou znázorněny na Obr. 3.32. Můžeme na nich pozorovat posun signálu směrem k nižším detekčním potenciálům se zvyšováním pH, obdobně jako u voltametrických měření. Jako optimální byl zvolen potenciál, při kterém byl



získán dostatečně vysoký signál, ale zároveň nedocházelo k výraznému nárůstu proudu pozadí. Těmto podmínkám odpovídá potenciál pracovní elektrody +1,2 V v mobilní fázi BR pufru o pH 5,5 s methanolem v poměru 40:60 (V/V).



**Obr. 3.32**

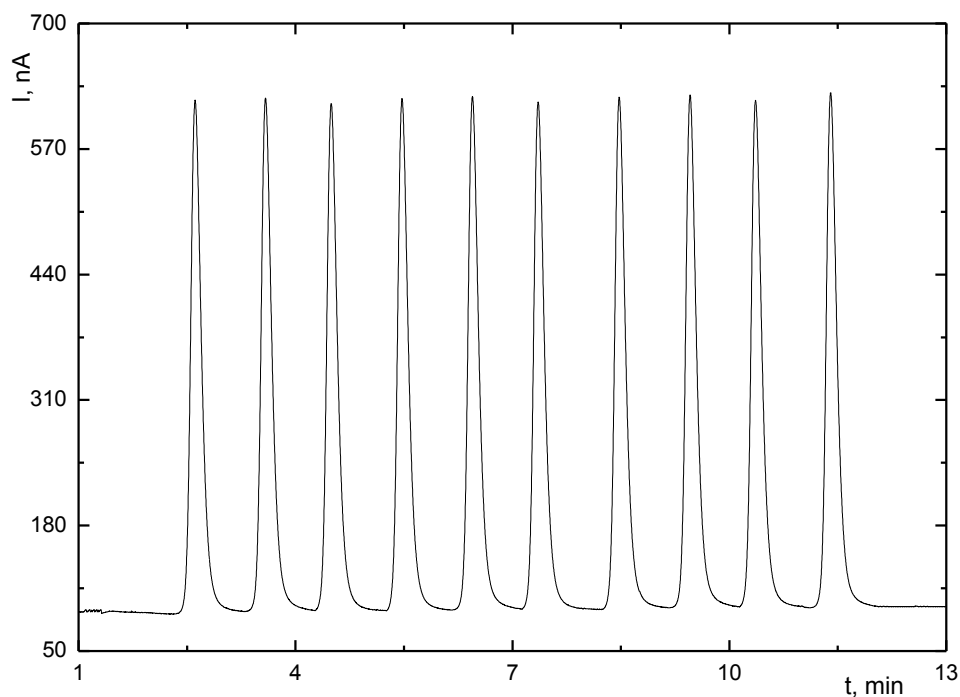
Závislost výšek píků na vloženém potenciálu pracovní elektrody pro různé pH mobilní fáze. Elektrochemická detekce, dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku carboxinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  ve směsi methanolu s vodou (50:50, V/V). Mobilní fáze MeOH a BR pufr o pH 2,5 (■), 4,5 (●), 5,5 (◆) a 6,5 (▲) v poměru 60:40 (V/V),  $Q = 1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Dále jsou zobrazeny proudy pozadí v prostředí BR pufru o pH 5,5 (◇) a 6,5 (Δ).

### 3.3.2 Opakovatelnost měření

Abychom vyloučili možnost pasivace nebo naopak narušování povrchu pracovní elektrody také při zapojení v chromatografickém systému, byla prozkoumána opakovatelnost měření elektrochemické detekce, a to desetinasobným nadávkováním 20  $\mu\text{l}$  roztoku carboxinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  ve směsi methanol s vodou v poměru 50:50 (V/V). Roztok byl dávkován v pravidelných minutových intervalech.

Měření probíhalo s využitím zjištěných optimálních podmínek, tj. mobilní fázi byl BR pufr o pH 5,5 s MeOH v poměru 40:60 (V/V), potenciál pracovní elektrody +1,2 V. Průtoková rychlost byla  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .

Výsledný záznam chromatogramů je zachycen na Obr. 3.33. Průměrná výška píků byla při využití elektrochemického detektoru 537,6 nA s relativní směrodatnou odchylkou 1,90 %, jak ukazuje statistické vyhodnocení opakovatelnosti měření (Tab. 3.9). Stejně jako u voltametrického měření tedy není nutná obnova elektrodového povrchu.



**Obr. 3.33**

HPLC-ED záznam deseti po sobě jdoucích měření na CPE bez obnovy povrchu. Měřeno v roztoku carboxinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  při potenciálu +1,2 V, dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku carboxinu ve směsi MeOH s  $\text{H}_2\text{O}$  (50:50, V/V). Mobilní fáze BR pufr pH 5,5 s MeOH (40:60, V/V),  $Q = 1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .

**Tab. 3.9**

Statistické vyhodnocení opakovatelnosti. Měřeno v roztoku carboxinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  při potenciálu +1,2 V, dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku carboxinu ve směsi MeOH s  $\text{H}_2\text{O}$  (50:50, V/V). Mobilní fáze BR pufr pH 5,5 s MeOH (40:60, V/V),  $Q = 1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .

výška píku [nA]	537,6
$s$ [nA]	10,2
$s_r$ [%]	1,90

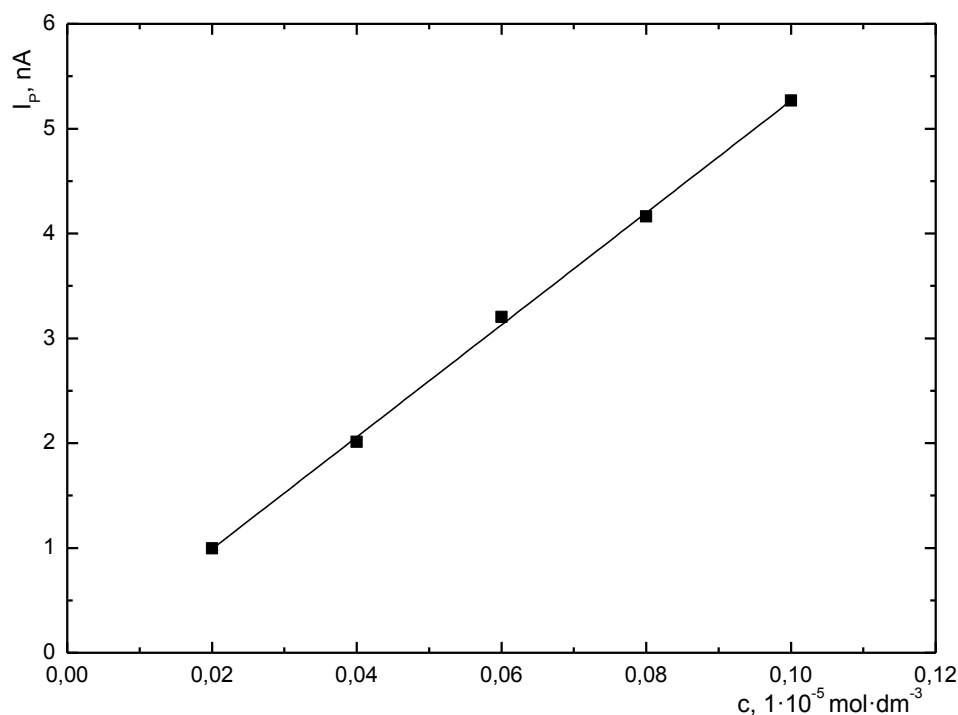
### 3.3.3 Kalibrační závislosti

Kalibrační závislosti roztoku carboxinu byly proměřeny při zjištěných optimálních podmínkách, a to metodou HPLC se spektrofotometrickou a elektrochemickou detekcí na CPE.

Proměřeny byly koncentrace carboxinu v rozmezí  $8 \cdot 10^{-8}$  až  $1 \cdot 10^{-4}$  mol·l<sup>-1</sup> ve směsi methanol s vodou v poměru 50:50 (V/V), mobilní fáze byla složena z Brittonova-Robinsonova pufru o pH 5,5 a methanolu v poměru 40:60 (V/V). Potenciál pracovní elektrody byl +1,2 V, průtoková rychlost 1 ml·min<sup>-1</sup>, dávkováno bylo 20 µl roztoku. Detekce UV/VIS detektorem probíhala při vlnové délce 251 nm.

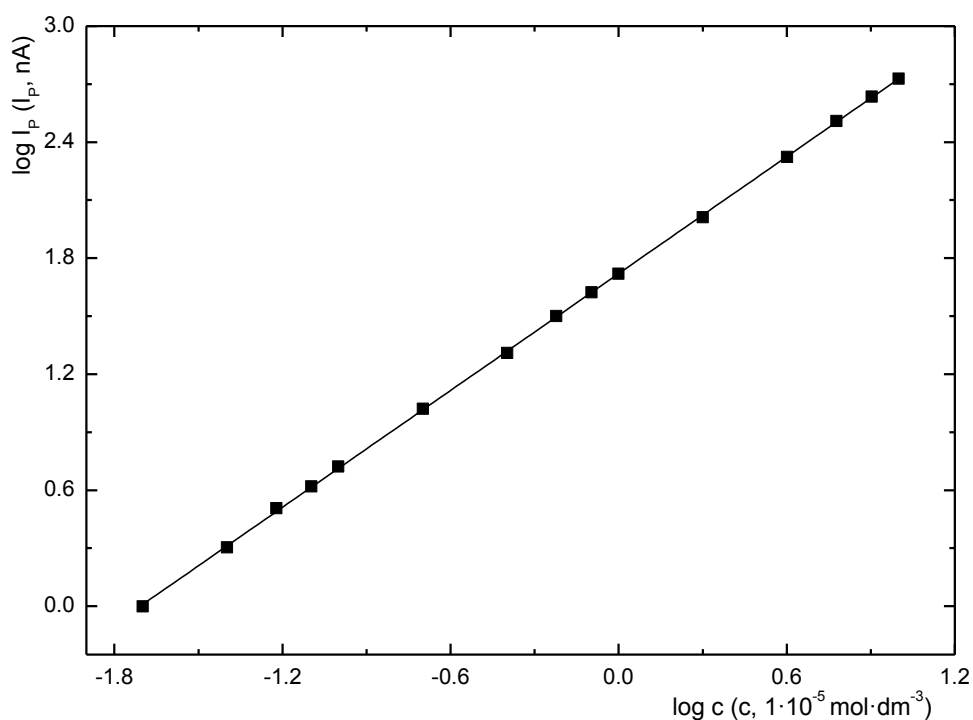
Kalibrační závislosti byly vyhodnoceny z výšek píků a byly zpracovány metodou lineární regrese. Kalibrační přímka nejnižšího koncentračního řádu ( $1 \cdot 10^{-6}$  až  $1 \cdot 10^{-7}$  mol·l<sup>-1</sup>) a v celém koncentračním rozmezí v logaritmické formě je pro elektrochemický detektor znázorněna na Obr. 3.43 a Obr. 3.35. Pro detektor spektrofotometrický jsou stejné závislosti zobrazeny na Obr. 3.36 a Obr. 3.37. Obr. 3.38 (Obr. 3.39) vykresluje reálné chromatografické záznamy nejnižšího naměřeného koncentračního řádu pro elektrochemický (spektrofotometrický) detektor.

Z parametrů kalibračních závislostí carboxinu uvedených v Tab. 3.10 (elektrochemický detektor), resp. v Tab. 3.11 (UV detektor) vyplývá, že naměřené závislosti jsou lineární, a to v celé koncentrační oblasti. Pro oba použité detektory tuto skutečnost dokazují jak hodnoty korelačních koeficientů, jejichž hodnoty se pohybují v rozmezí 0,9996 až 0,9999, tak i směrnice logaritmické závislosti, která je blízká či rovna jedné.



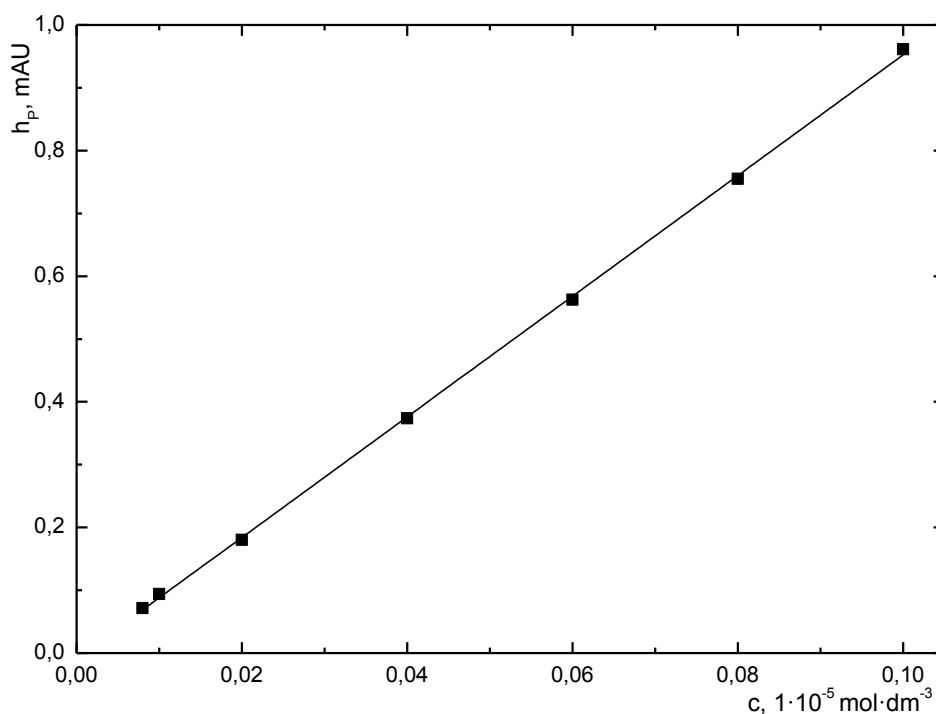
**Obr. 3.34**

Kalibrační závislost carboxinu v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , vyhodnoceno z výšek píků. Měřeno metodou HPLC-ED na CPE při potenciálu +1,2 V, dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku carboxinu ve směsi MeOH s  $\text{H}_2\text{O}$  (50:50, V/V). Mobilní fáze BR pufr o pH 5,5 s MeOH (40:60, V/V),  $Q = 1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .



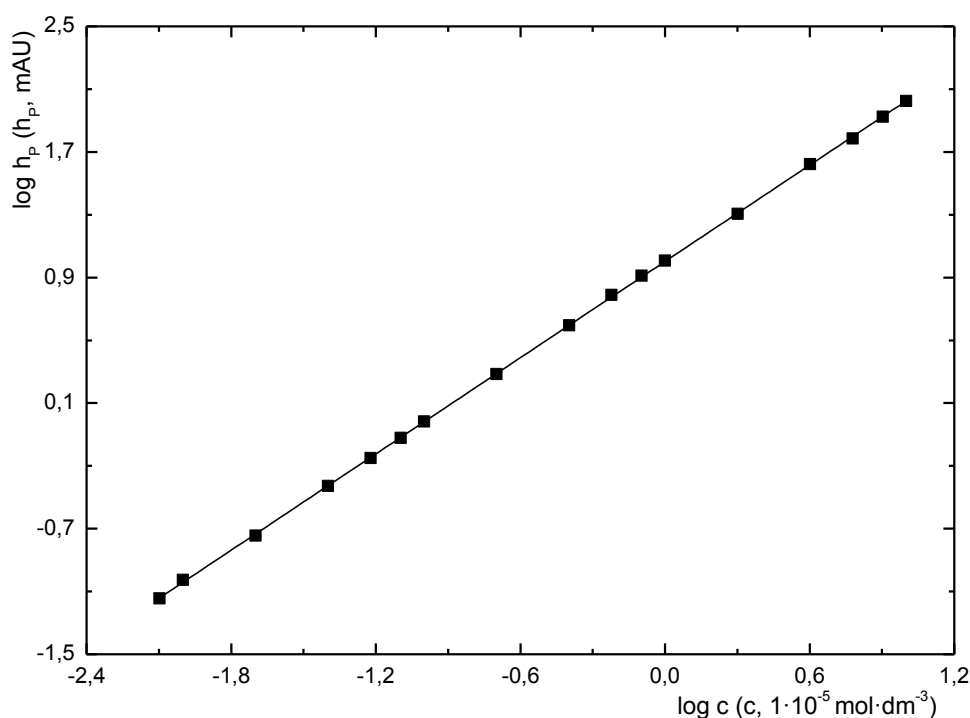
**Obr. 3.35**

Kalibrační závislost carboxinu v logaritmické formě v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , vyhodnocena z výšek píků. Měřeno metodou HPLC-ED na CPE při potenciálu +1,2 V, dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku carboxinu ve směsi MeOH s  $\text{H}_2\text{O}$  (50:50, V/V). Mobilní fáze BR pufr pH 5,5 s MeOH (40:60, V/V),  $Q = 1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .



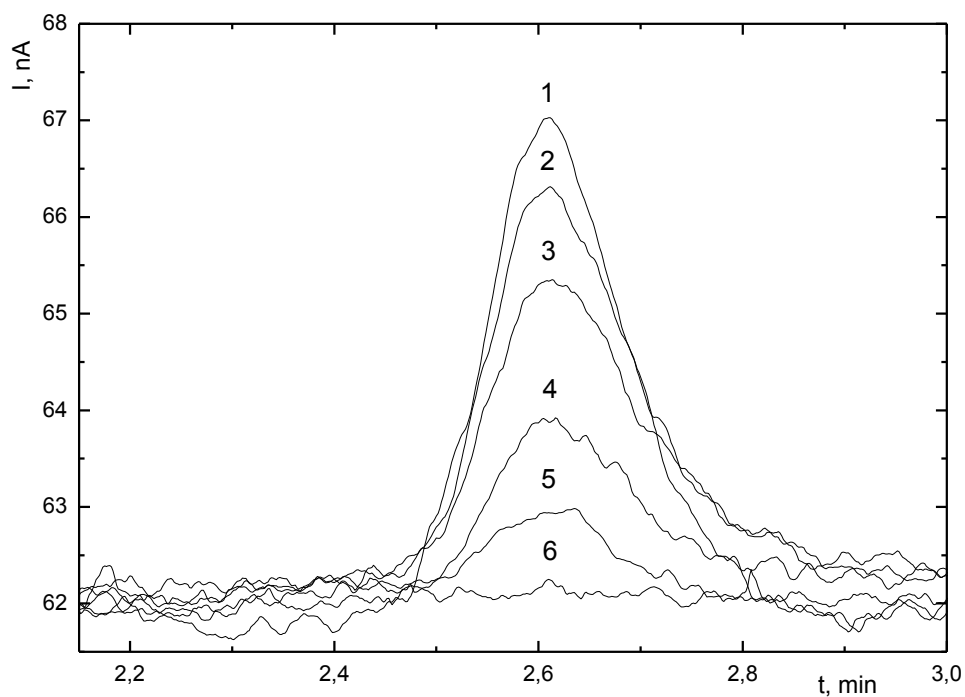
**Obr. 3.36**

Kalibrační závislost carboxinu v koncentračním rozmezí  $8 \cdot 10^{-8}$  až  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , vyhodnoceno z výšek píku. Měřeno metodou HPLC-UV ( $\lambda = 251 \text{ nm}$ ), dávkováno  $20 \mu\text{l}$  roztoku carboxinu ve směsi MeOH s  $\text{H}_2\text{O}$  (50:50, V/V). Mobilní fáze BR pufr o pH 5,5 s MeOH (40:60, V/V),  $Q = 1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .



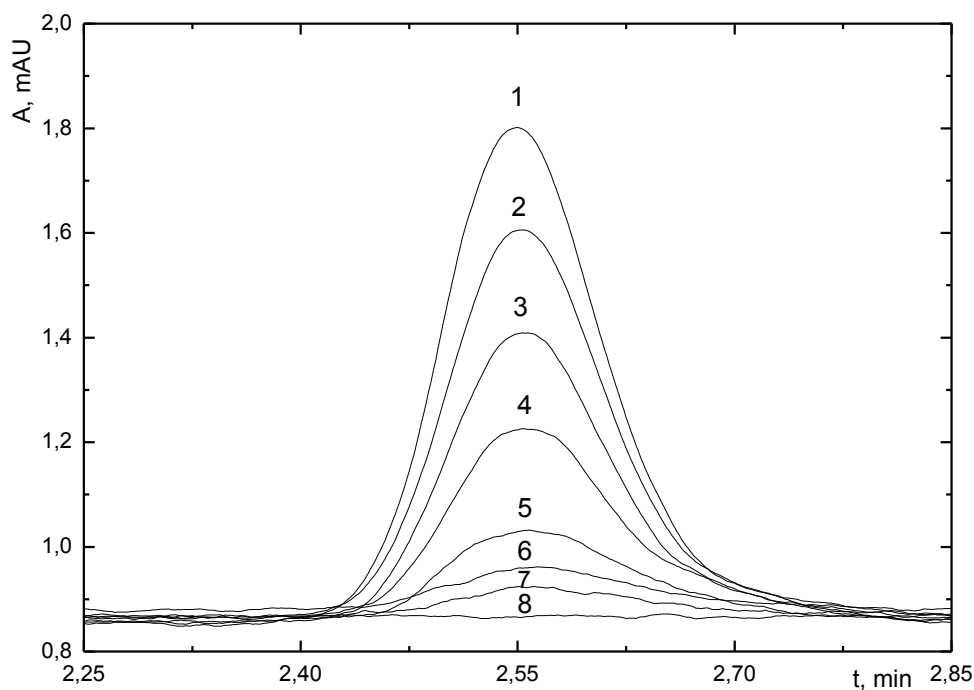
**Obr. 3.37**

Kalibrační závislost carboxinu v logaritmické formě v koncentračním rozmezí  $8 \cdot 10^{-8}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , vyhodnocena z výšek píku. Měřeno metodou HPLC-UV ( $\lambda = 251 \text{ nm}$ ), dávkováno  $20 \mu\text{l}$  roztoku carboxinu ve směsi MeOH s  $\text{H}_2\text{O}$  (50:50, V/V). Mobilní fáze BR pufr o pH 5,5 s MeOH (40:60, V/V),  $Q = 1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .



**Obr. 3.38**

Chromatogramy roztoku carboxinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-6}$  (**1**),  $8 \cdot 10^{-7}$  (**2**),  $6 \cdot 10^{-7}$  (**3**),  $4 \cdot 10^{-7}$  (**4**),  $2 \cdot 10^{-7}$  (**5**)  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a základní elektrolyt (**6**). Měřeno metodou HPLC-ED na CPE při potenciálu +1,2 V, dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku carboxinu ve směsi MeOH s  $\text{H}_2\text{O}$  (50:50, V/V). Mobilní fáze BR pufr pH 5,5 s MeOH (40:60, V/V),  $Q = 1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .



**Obr. 3.39**

Chromatogramy roztoku carboxinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-6}$  (**1**),  $8 \cdot 10^{-7}$  (**2**),  $6 \cdot 10^{-7}$  (**3**),  $4 \cdot 10^{-7}$  (**4**),  $2 \cdot 10^{-7}$  (**5**),  $1 \cdot 10^{-7}$  (**6**),  $8 \cdot 10^{-8}$  (**7**)  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a základní elektrolyt (**8**). Měřeno metodou HPLC-UV ( $\lambda = 251 \text{ nm}$ ), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku carboxinu ve směsi MeOH s  $\text{H}_2\text{O}$  (50:50, V/V). Mobilní fáze BR pufr pH 5,5 s MeOH (40:60, V/V),  $Q = 1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .

**Tab. 3.10**

Parametry kalibračních závislostí carboxinu pro HPLC s elektrochemickou detekcí na CPE při potenciálu +1,2 V. Vyhodnoceno z výšek píků.

$c$ (mol·l <sup>-1</sup> )	směrnice (mA·mol <sup>-1</sup> ·l)	úsek (nA)	$R$	$L_D$ (mol·l <sup>-1</sup> )
$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	5,40	-3,3	0,9999	-
$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	5,25	-0,1	0,9999	-
$2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6}$	5,35	-0,1	0,9996	-
$2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	5,36	-0,8	0,9999	$1,1 \cdot 10^{-7}$

Parametry logaritmické závislosti:  $\log I = a \log c + b$ ;  $a = 1,00$ ;  $b = 1,72$ ;  $R = 0,9999$

**Tab. 3.11**

Parametry kalibračních závislostí carboxinu pro HPLC se spektrofotometrickou detekcí při vlnové délce 251 nm. Vyhodnoceno z výšek píků.

$c$ (mol·l <sup>-1</sup> )	směrnice (kAU·mol <sup>-1</sup> ·l)	úsek (mAU)	$R$	$L_D$ (mol·l <sup>-1</sup> )
$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	1,06	-0,9	0,9997	-
$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	1,03	-0,1	0,9999	-
$8 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-6}$	0,96	0,0	0,9998	-
$8 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-4}$	1,05	-0,2	0,9999	$8,1 \cdot 10^{-8}$

Parametry logaritmické závislosti:  $\log I = a \log c + b$ ;  $a = 1,02$ ;  $b = 1,00$ ;  $R = 0,9999$

### 3.3.4 Modelové vzorky

Stejně jako v případě voltametrických metod byla i tato nově vyvinutá chromatografická metoda aplikována na modelové vzorky pitné a říční vody, aby se ověřila její využitelnost v praxi.

#### *Stanovení carboxinu v pitné vodě*

Pitná voda, zpracovaná stejně jako v případě stanovení carboxinu metodou DPV na CPE, byla první zkoumanou matricí.

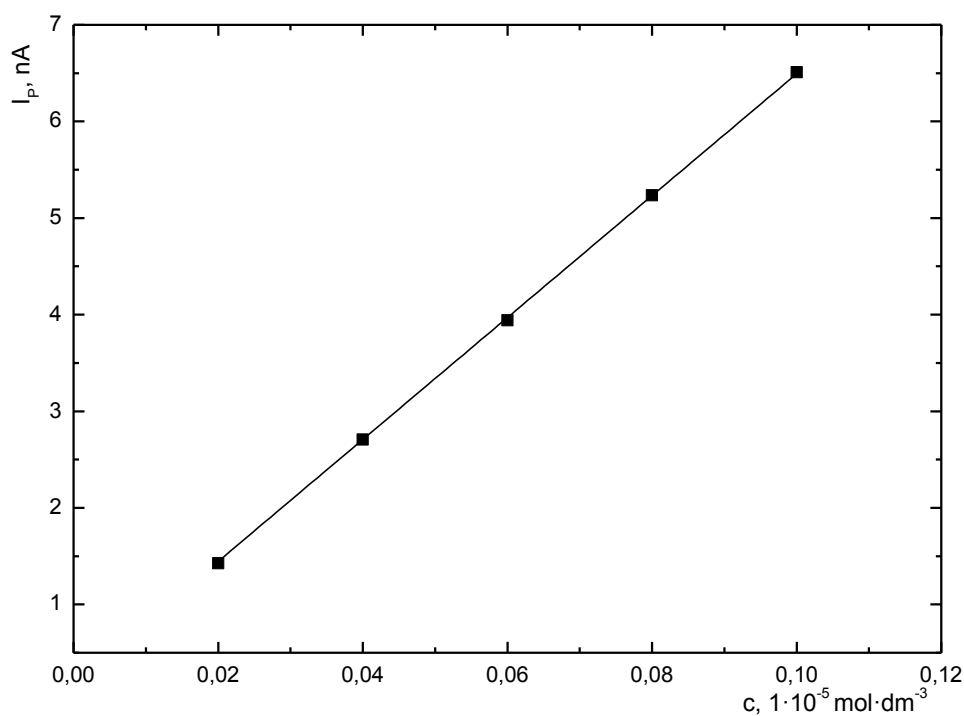
Modelový vzorek byl připraven v den měření, a to odpipetováním potřebného množství pitné vody s přidavkem analytu a doplněním pitnou vodou na objem 10 ml. Měření probíhala za zjištěných optimálních podmínek.

Koncentrační závislosti byly naměřeny v rozsahu  $1 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-4}$  mol·l<sup>-1</sup> v pořadí od vyšších k nižším koncentracím. Logaritmická forma změřené závislosti je ukázána na Obr. 3.40 pro elektrochemickou detekci, stejná závislost zachycena detektorem spektrofotometrickým je pak na Obr. 3.42. Obr. 3.41 (ED) a Obr. 3.43 (UV detekce) zobrazuje kalibrační závislosti posledního naměřeného řádu. Reálné záznamy chromatografických křivek detekované pomocí CPE jsou vykresleny na Obr. 3.44, tytéž křivky získané s využitím spektrofotometrického detektoru jsou zaznamenány na Obr. 3.45.

Parametry kalibračních závislostí, jež byly vyhodnoceny z dat získaných pomocí elektrochemického detektoru, jsou shrnuty v Tab. 3.12. Tab. 3.13 pak odráží parametry téže závislosti získané pomocí detektoru spektrofotometrického. Z uvedených dat, která jsou srovnatelná s parametry kalibračních přímek získaných při stanovení carboxinu v deionizované vodě, vyplývá, že jsou naměřené závislosti lineární v celém koncentračním rozmezí. Tento fakt potvrzují také směrnice kalibračních přímek, které se pro oba použité detektory blíží hodnotě jedna.

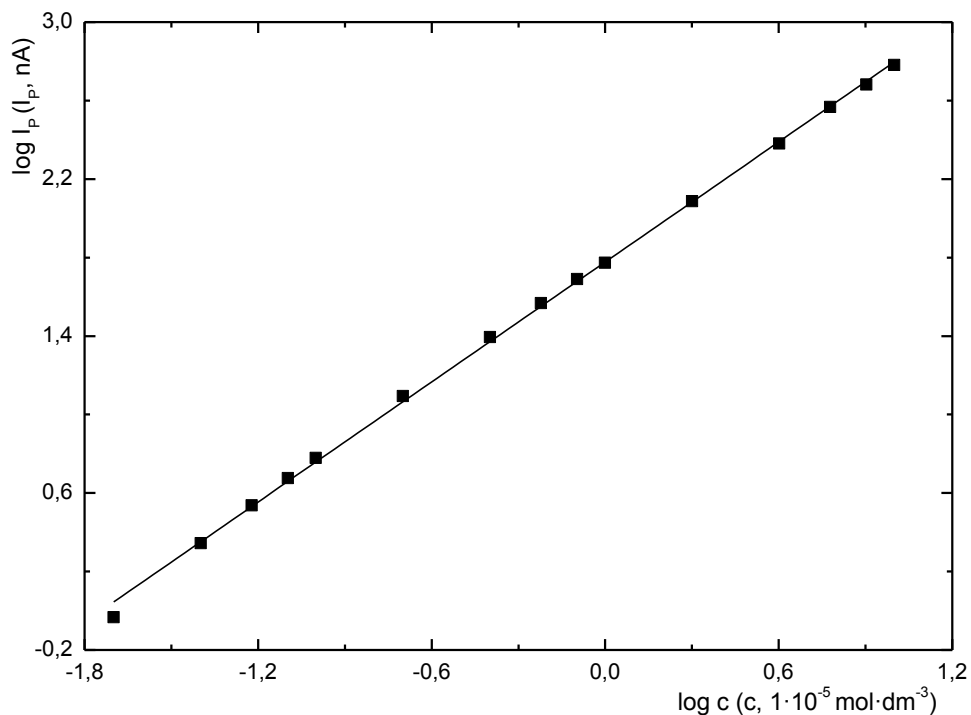
Mez detekce získaná metodou HPLC-ED na CPE je  $1,6 \cdot 10^{-7}$  mol·l<sup>-1</sup>, metoda HPLC-UV vykazuje obdobnou detekční mez, a sice  $1,1 \cdot 10^{-7}$  mol·l<sup>-1</sup>. V porovnání s mezemi detekce získanými při stanovení carboxinu v deionizované vodě se tyto hodnoty nikterak významně neliší.





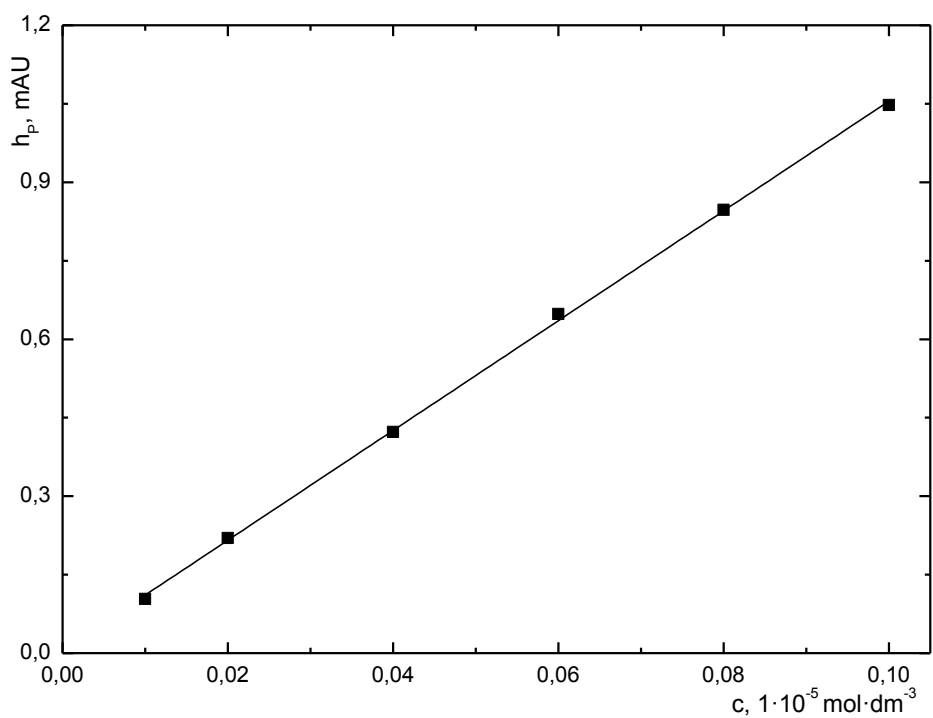
**Obr. 3.40**

Kalibrační závislost carboxinu v pitné vodě v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , vyhodnoceno z výšek píků. Měřeno metodou HPLC-ED na CPE při potenciálu +1,2 V, dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku carboxinu v pitné vodě. Mobilní fáze BR pufr o pH 5,5 s MeOH (40:60, V/V),  $Q = 1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .



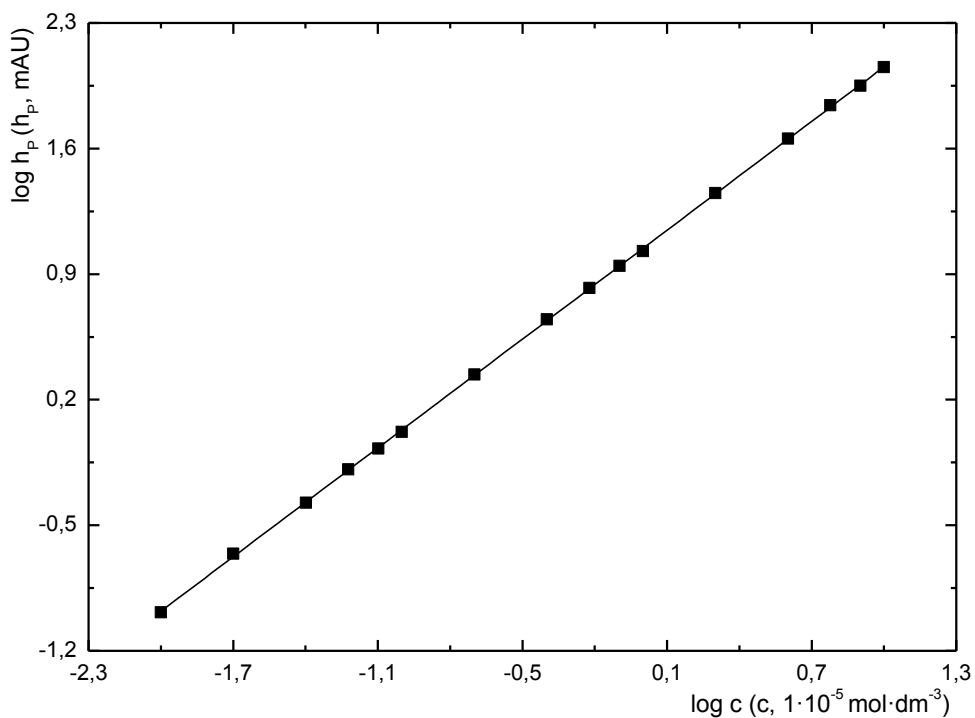
**Obr. 3.41**

Logaritmická forma kalibrační závislosti carboxinu v pitné vodě v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , vyhodnoceno z výšek píků. Měřeno metodou HPLC-ED na CPE při potenciálu +1,2 V, dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku carboxinu v pitné vodě. Mobilní fáze BR pufr o pH 5,5 s MeOH (40:60, V/V),  $Q = 1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .



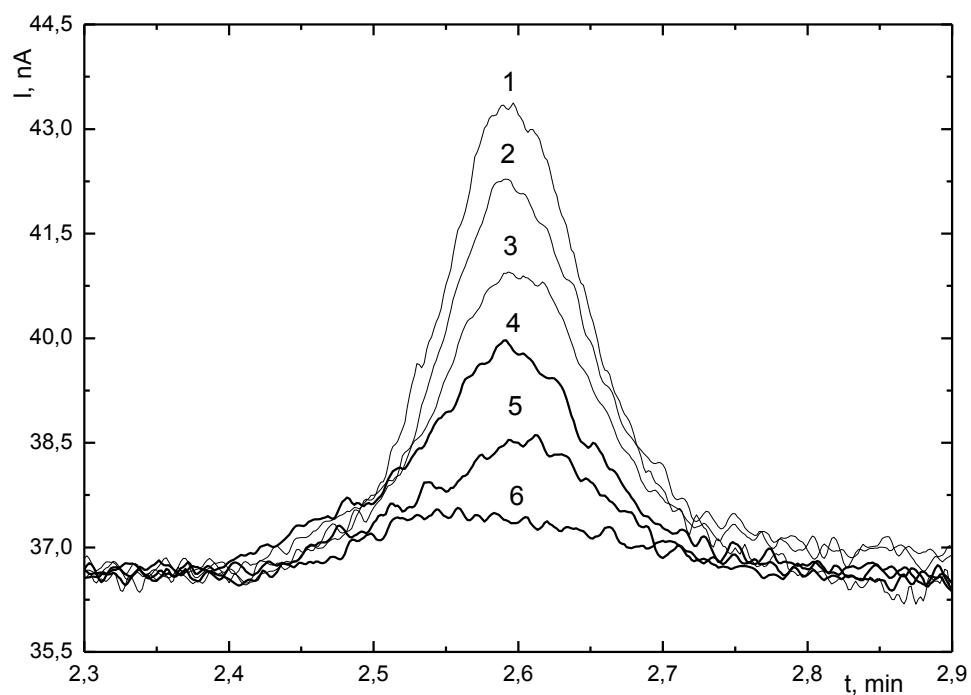
**Obr. 3.42**

Kalibrační závislost carboxinu v pitné vodě v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , vyhodnoceno z výšek píků. Měřeno metodou HPLC-UV ( $\lambda = 251$ ), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku carboxinu. Mobilní fáze BR pufr o pH 5,5 s MeOH (40:60, V/V),  $Q = 1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .



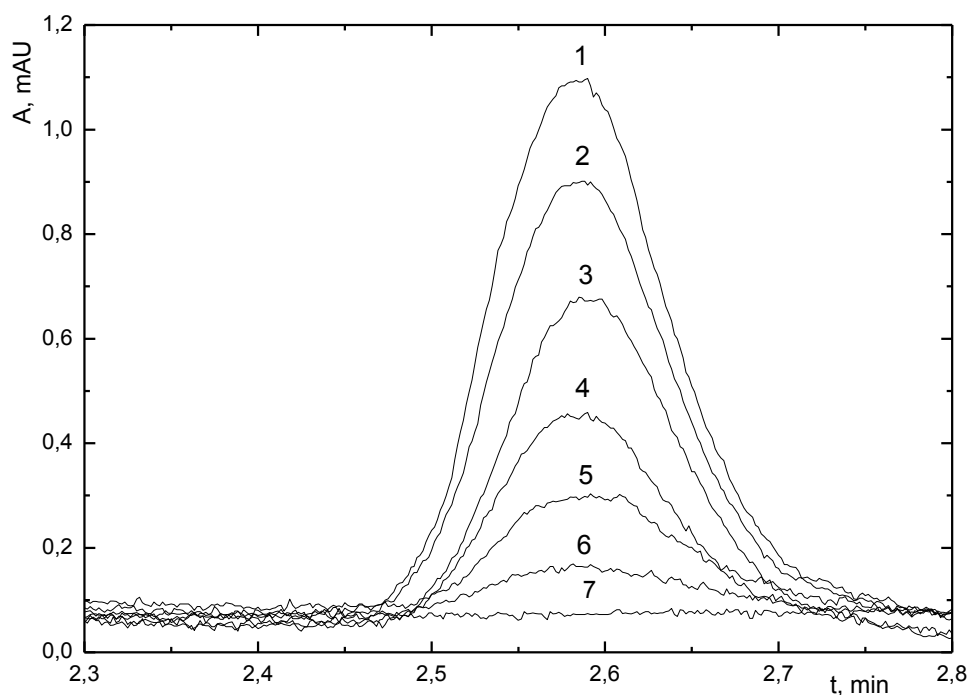
**Obr. 3.43**

Logaritmická forma kalibrační závislosti carboxinu v pitné vodě v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , vyhodnocena z výšek píků. Měřeno metodou HPLC-UV ( $\lambda = 251$ ), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku carboxinu. Mobilní fáze BR pufr o pH 5,5 s MeOH (40:60, V/V),  $Q = 1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .



**Obr. 3.44**

Chromatogramy roztoku carboxinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-6}$  (1),  $8 \cdot 10^{-7}$  (2),  $6 \cdot 10^{-7}$  (3),  $4 \cdot 10^{-7}$  (4),  $2 \cdot 10^{-7}$  (5)  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a základní elektrolyt (6). Měřeno metodou HPLC-ED na CPE při potenciálu +1,2 V, dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku carboxinu pitné vodě. Mobilní fáze BR pufr pH 5,5 s MeOH (40:60, V/V),  $Q = 1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .



**Obr. 3.45**

Chromatogramy roztoku carboxinu v říční vodě koncentraci  $1 \cdot 10^{-6}$  (1),  $8 \cdot 10^{-7}$  (2),  $6 \cdot 10^{-7}$  (3),  $4 \cdot 10^{-7}$  (4),  $2 \cdot 10^{-7}$  (5),  $1 \cdot 10^{-7}$  (6)  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a základní elektrolyt (7). Měřeno metodou HPLC-UV ( $\lambda = 251 \text{ nm}$ ), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku carboxinu v pitné. Mobilní fáze BR pufr pH 5,5 s MeOH (40:60, V/V),  $Q = 1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .

**Tab. 3.12**

Parametry kalibračních závislostí carboxinu v pitné vodě pro HPLC s elektrochemickou detekcí na CPE při potenciálu +1,2 V. Vyhodnoceno z výšek píků.

$c$ (mol·l <sup>-1</sup> )	směrnice (mA·mol <sup>-1</sup> ·l)	úsek (nA)	$R$	$L_D$ (mol·l <sup>-1</sup> )
$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	6,04	0,5	0,9998	-
$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	5,99	0,6	0,9994	-
$2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6}$	6,35	-0,3	1,0000	-
$2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	6,04	0,2	0,9999	$1,6 \cdot 10^{-7}$

Parametry logaritmické závislosti:  $\log I = a \log c + b$ ;  $a = 1,02$ ;  $b = 1,78$ ;  $R = 0,9996$

**Tab. 3.13**

Parametry kalibračních závislostí carboxinu v pitné vodě pro HPLC se spektrofotometrickou detekcí při vlnové délce 251 nm. Vyhodnoceno z výšek píků.

$c$ (mol·l <sup>-1</sup> )	směrnice (kAU·mol <sup>-1</sup> ·l)	úsek (mAU)	$R$	$L_D$ (mol·l <sup>-1</sup> )
$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	1,13	-0,1	0,9997	-
$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	1,08	-0,1	0,9999	-
$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6}$	1,05	0,0	0,9997	-
$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	1,13	-0,1	0,9999	$1,1 \cdot 10^{-7}$

Parametry logaritmické závislosti:  $\log I = a \log c + b$ ;  $a = 1,01$ ;  $b = 1,04$ ;  $R = 0,9999$

### ***Stanovení carboxinu v říční vodě***

Druhou zkoumanou matricí, na kterou byla přenesena metoda stanovení carboxinu pomocí HPLC-ED na CPE, byla říční voda, vzorkovaná stejně jako u voltametrických měření.

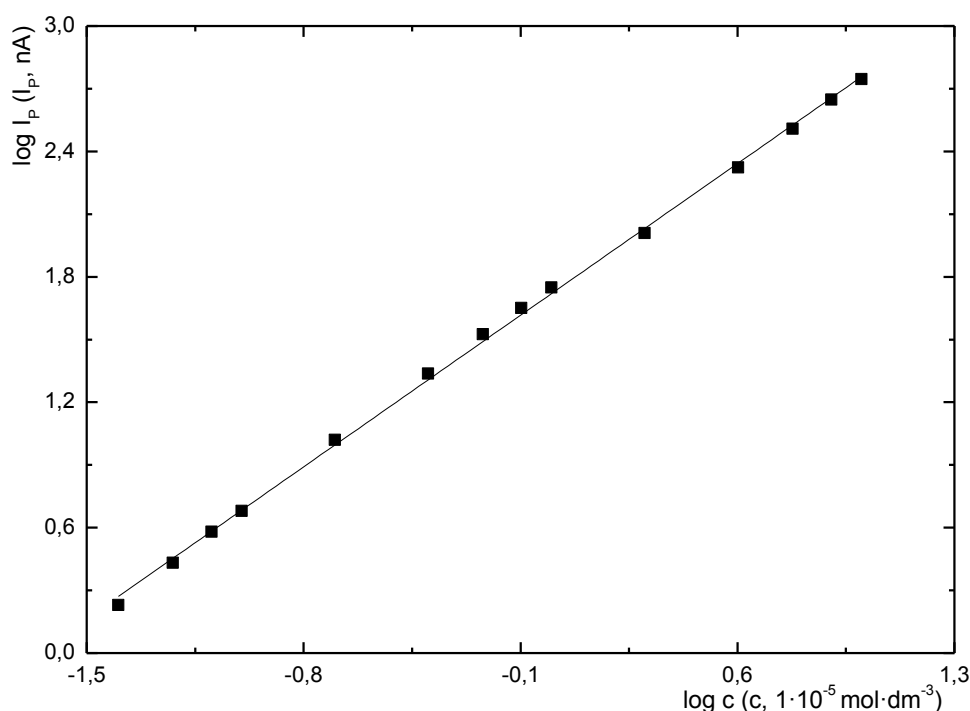
Vzorek carboxinu v říční vodě byl připraven odpipetováním přesného množství říční vody a přidavkem analytu a doplněním říční vodou na objem 10 ml.

Kalibrační závislosti byly proměřeny v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-4}$  až  $2 \cdot 10^{-7}$  mol·l<sup>-1</sup> směrem k nižším koncentracím. Na Obr. 3.46 lze vidět logaritmickou formu kalibrační křivky, na Obr. 3.47 pak kalibrační přímku posledních dvou změřených koncentrací, obě křivky získané elektrochemickou detekcí. Stejně závislosti, avšak získané s využitím spektrofotometrického detektoru, jsou zaznamenány na Obr. 3.48, resp. Obr. 3.49. Reálné chromatogramy posledního koncentračního řádu

včetně základního elektrolytu jsou zachyceny na Obr. 3.50 (ED) a Obr. 3.51 (UV detektor).

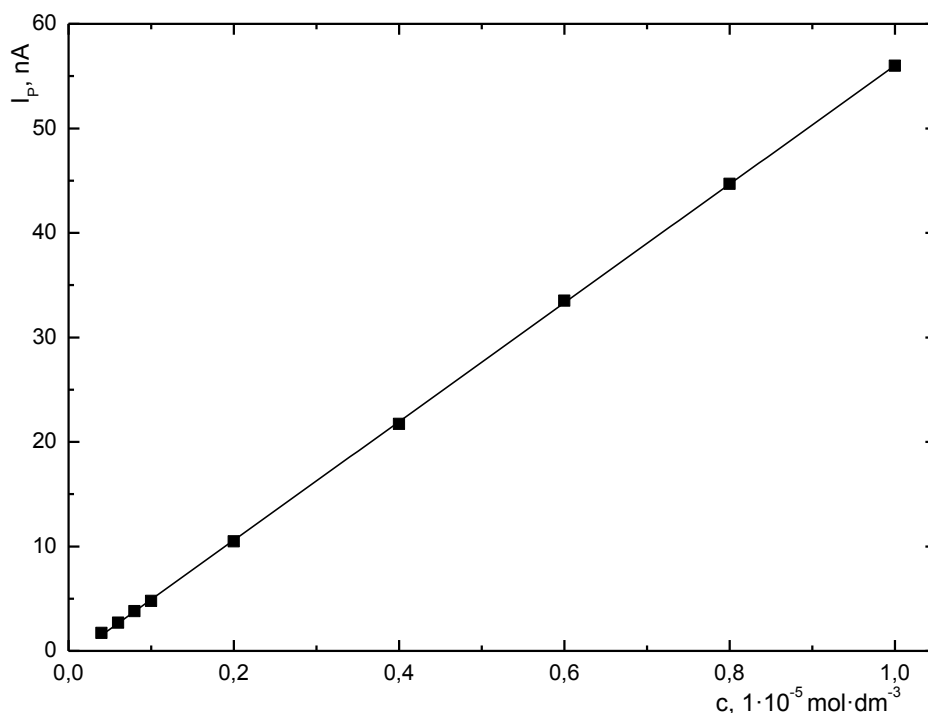
V Tab. 3.14 jsou shrnuty parametry kalibračních závislostí HPLC-ED metody vyhodnocené metodou lineární regrese. Hodnoty v Tab. 3.15 ukazují tytéž parametry detektoru spektrofotometrického. O linearitě kalibrační přímky v celé měřené oblasti pak hovoří nejen korelační koeficienty, které se v případě elektrochemického detektoru pohybují v rozmezí 0,9995 až 1,000, ale také směrnice logaritmické závislosti, jež se stejně jako u stanovení carboxinu v deionizované či pitné vodě blíží jedné. O stejné linearitě pak lze hovořit také u UV detektoru.

Meze detekce  $3,1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (ED) a  $2,3 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (UV detektor) jsou porovnatelné s mezemi detekce získanými při stanovení carboxinu v deionizované a říční vodě. Mírně vyšší hodnoty obou zjištěných  $L_D$  mohou být přičteny vyššímu šumu, který lze při stanovení v matrici říční vody pozorovat.



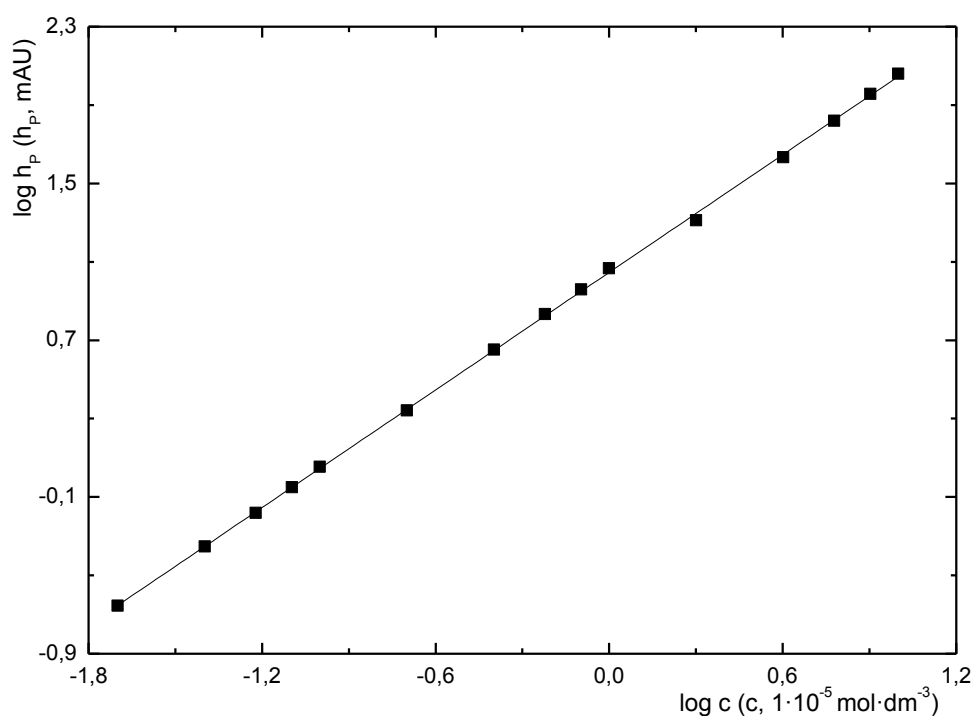
**Obr. 3.46**

Logaritmická forma kalibrační závislosti carboxinu v říční vodě v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , vyhodnocena z výšek píků. Měřeno metodou HPLC-ED na CPE při potenciálu +1,2 V, dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku carboxinu v říční vodě. Mobilní fáze BR pufr o pH 5,5 s MeOH (40:60, V/V),  $Q = 1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .



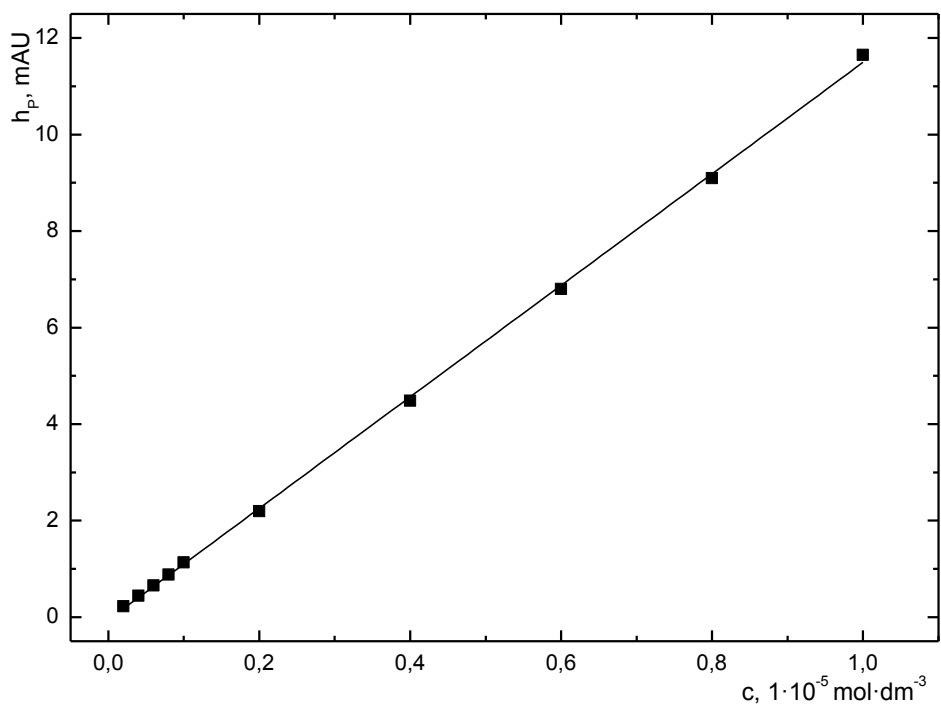
**Obr. 3.47**

Kalibrační závislost carboxinu v říční vodě v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , vyhodnoceno z výšek píků. Měřeno metodou HPLC-ED na CPE při potenciálu +1,2 V, dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku carboxinu v říční vodě. Mobilní fáze BR pufr o pH 5 s MeOH (40:60, V/V),  $Q = 1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .



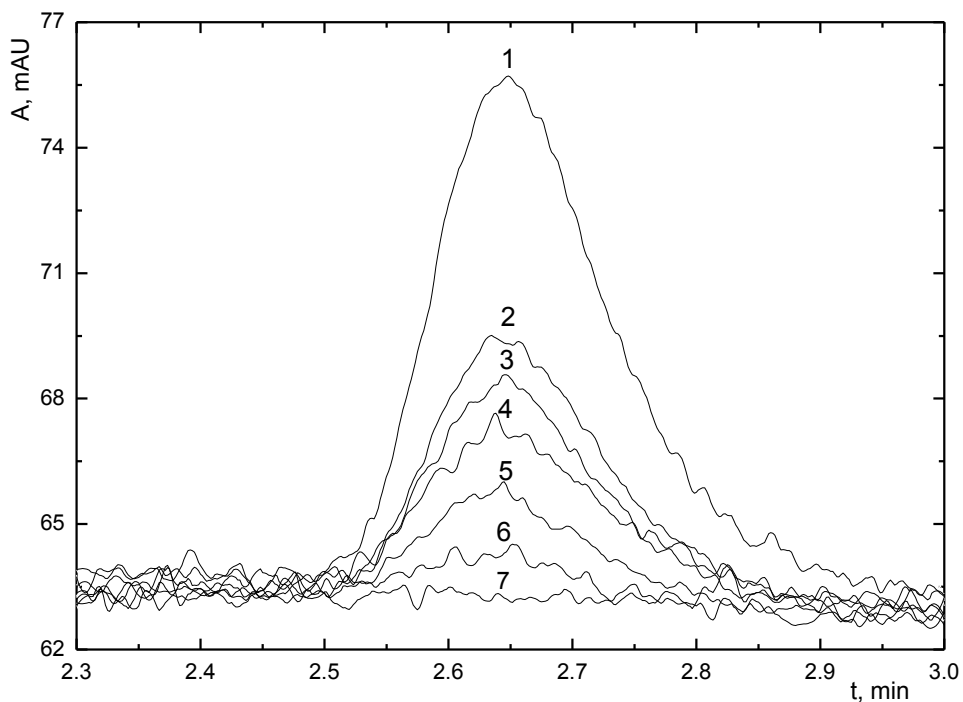
**Obr. 3.48**

Logaritmická forma kalibrační závislosti carboxinu v říční vodě v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , vyhodnocena z výšek píků. Měřeno metodou HPLC-UV ( $\lambda = 251$ ), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku carboxinu v říční vodě. Mobilní fáze BR pufr o pH 5,5 s MeOH (40:60, V/V),  $Q = 1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .



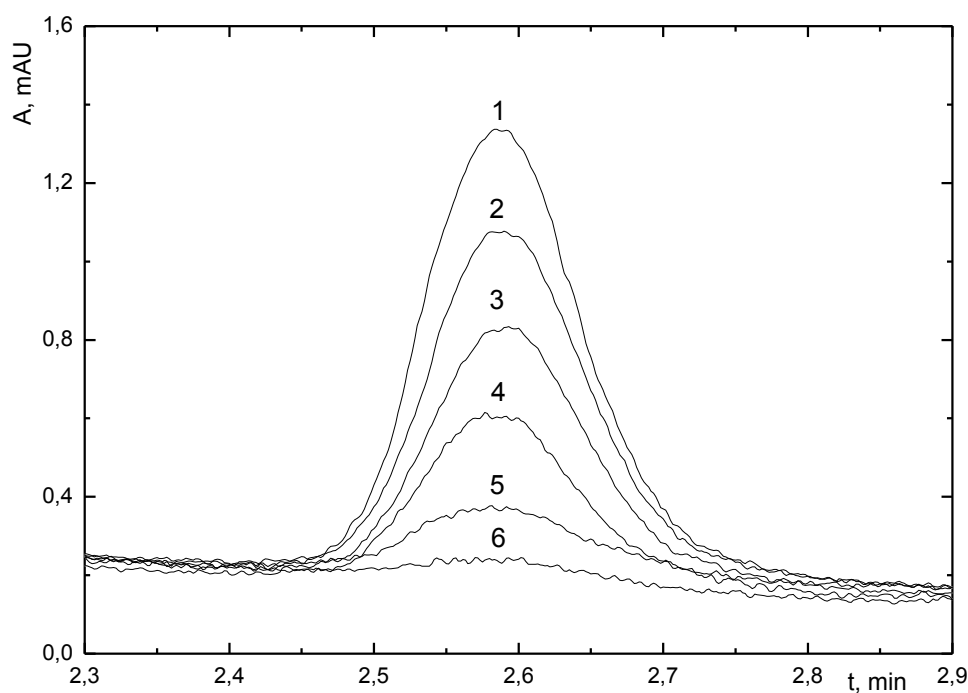
**Obr. 3.49**

Kalibrační závislost carboxinu v říční vodě v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , vyhodnoceno z výšek píků. Měřeno metodou HPLC-UV ( $\lambda = 251$ ), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku carboxinu v říční vodě. Mobilní fáze BR pufr o pH 5,5 s MeOH (40:60, V/V),  $Q = 1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .



**Obr. 3.50**

Chromatogramy roztoku carboxinu o koncentraci  $4 \cdot 10^{-6}$  (1),  $2 \cdot 10^{-7}$  (2),  $1 \cdot 10^{-6}$  (3),  $8 \cdot 10^{-7}$  (4),  $6 \cdot 10^{-7}$  (5),  $4 \cdot 10^{-7}$  (6)  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a základní elektrolyt (7). Měřeno metodou HPLC-ED na CPE při potenciálu +1,2 V, dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku carboxinu v říční vodě. Mobilní fáze BR pufr pH 5,5 s MeOH (40:60, V/V),  $Q = 1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .



**Obr. 3.51**

Chromatogramy roztoku carboxinu v říční vodě o koncentraci  $1 \cdot 10^{-6}$  (**1**),  $8 \cdot 10^{-7}$  (**2**),  $6 \cdot 10^{-7}$  (**3**),  $4 \cdot 10^{-7}$  (**4**),  $2 \cdot 10^{-7}$  (**5**)  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a základní elektrolyt (**6**). Měřeno metodou HPLC-UV ( $\lambda=251 \text{ nm}$ ), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku carboxinu v říční vodě. Mobilní fáze BR pufr pH 5,5 s MeOH (40:60, V/V),  $Q = 1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .

**Tab. 3.14**

Parametry kalibračních závislostí carboxinu v říční vodě pro HPLC s elektrochemickou detekcí na CPE při potenciálu +1,2 V. Vyhodnoceno z výšek píků.

$c$ ( $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ )	směrnice ( $\text{mA} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$ )	úsek (nA)	$R$	$L_D$ ( $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ )
$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	5,63	-8,4	0,9995	-
$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	5,70	-0,9	1,0000	-
$4 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6}$	5,17	-0,4	0,9998	-
$4 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	5,53	-1,8	0,9997	$3,1 \cdot 10^{-7}$

Parametry logaritmické závislosti:  $\log I = a \log c + b$ ;  $a = 1,04$ ;  $b = 1,72$ ;  $R = 0,9995$



**Tab. 3.15**

Parametry kalibračních závislostí carboxinu v říční vodě pro HPLC se spektrofotometrickou detekcí při vlnové délce 251 nm. Vyhodnoceno z výšek píků.

$c$ (mol·l <sup>-1</sup> )	směrnice (kAU·mol <sup>-1</sup> ·l)	úsek (mAU)	$R$	$L_D$ (mol·l <sup>-1</sup> )
$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	1,16	-2,0	0,9994	-
$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	1,16	-0,1	0,9997	-
$2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6}$	1,14	0,0	0,9997	-
$2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	1,13	-0,3	0,9996	$2,3 \cdot 10^{-7}$

Parametry logaritmické závislosti:  $\log I = a \log c + b$ ;  $a = 1,00$ ;  $b = 1,05$ ;  $R = 0,9999$

### 3.4 Extrakce tuhou fází

Extrakční kolonky byly napojeny na dvanáctimístný vakuový manifold, spojený přes pojistnou lahev s pumpou zajišťující trvalý podtlak. Podtlak byl kontrolovaný manometrem tak, aby nepřekračoval povolené meze.

Extrakce carboxinu na tuhou fázi byla proveden následovně: kolonky byly aktivovány podle pokynů výrobce [50] daným množstvím methanolu a deionizované vody bez použití podtlaku, poté byl přes kolonku rychlostí cca 1 ml za minutu přesáto 100 ml vzorku carboxinu v deionizované vodě o koncentraci  $5 \cdot 10^{-6}$  mol·l<sup>-1</sup>. Stacionární fáze kolonky byla následně promyta 1 ml vody a prosušena vzduchem.

Z HPLC-UV záznamů vzniklého eluátu bylo zjištěno, že jedinou kolonkou zachycující více než 99% analytu je LiChrolut EN, 200 mg, 3 ml se stacionární fází tvořenou polymerem ethylvinylbenzenu a divinylbenzenu, jež byla použita pro další měření.

#### 3.4.1 Optimalizace podmínek pro extrakci tuhou fází

První optimalizace SPE byla zaměřena na nalezení vhodného rozpouštědla pro eluci carboxinu s ohledem na dosažení vysokého výtěžku. Objem použitého rozpouštědla byl vždy 10 ml.

Zachycený carboxin byl eluován do vialek a následně odpařen do sucha dusíkem při teplotě 50 °C. Poté byl proveden HPLC-UV záznam carboxinu o koncentraci

$5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v prostředí methanol:voda v poměru 50:50 (V/V). Dosažené hodnoty výtěžnosti jsou uvedeny v Tab. 3.16.

Procentuální výtěžek SPE byl určen z poměru  $h_P / h_P^0$ , kde  $h_P$  je výška píku po SPE vodného roztoku carboxinu o příslušné koncentraci a  $h_P^0$  je výška píku carboxinu v roztoku připraveném extrakcí slepého vzorku, k němuž byl po SPE přidán potřebný objem zásobního roztoku carboxinu. Všechna měření byla provedena na nejméně dvou extrakčních kolonkách.

Vzhledem k nízké výtěžnosti (max. 71,3 % při použití methanolu) byla proměřena také stálost výtěžnosti napříč předpokládaným koncentračním rozmezím kalibračních závislostí, tj.  $5 \cdot 10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-7}$ ,  $5 \cdot 10^{-8}$  a  $5 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Z uvedené tabulky (Tab. 3.17) vyplývá, že výtěžnost se s klesající koncentrací snižuje, a to až na hodnotu 27,8 % (při koncentraci  $5 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) což je z hlediska využití SPE kolonek nevyhovující.

Ačkoliv tedy některé extrační kroky vedly k zakoncentrování stanovované látky, neumožnila žádná z použitých kolonek možnost výrazného snížení meze detekce.

**Tab. 3.16**

Výtěžnost extrakce tuhou fází získaná při použití různých rozpouštědel. Koncentrace carboxinu (před SPE)  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Měřeno metodou HPLC se spektrofotometrickou detekcí při vlnové délce 251 nm. Vyhodnoceno z výšek píků.

použité rozpouštědlo	výtěžnost (%)
aceton	56,0
acetonitril	58,6
diethylether	- <sup>a</sup>
dioxan	12,4
ethylacetát	64,7
isopropylalkohol	28,7
<b>methanol</b>	<b>71,3</b>
methanol:amoniak = 99:1 (V/V)	65,9
methanol:ethylster octové kyseliny = 50:50 (V/V)	60,1
methanol:octová kyselina = 99:1 (V/V)	70,3
tetrahydrofuran	16,7
toluen	32,2

<sup>a</sup> – změna retenčního času

**Tab. 3.17**

Výtěžnost extrakce tuhou fází napříč koncentračními řády při použití 10 ml methanolu. Měřeno metodou HPLC se spektrofotometrickou detekcí při vlnové délce 251 nm. Vyhodnoceno z výšek píků.

$c$ (mol·l <sup>-1</sup> )	výtěžnost (%)
$5 \cdot 10^{-6}$	71,3
$5 \cdot 10^{-7}$	70,6
$5 \cdot 10^{-8}$	39,1
$5 \cdot 10^{-9}$	27,8

## 4. ZÁVĚR

V předkládané diplomové práci byly prostudovány možnosti stanovení pesticidu carboxinu metodami DPV, HPLC-ED a HPLC-UV s použitím uhlíkové pastové elektrody. Dále byl testován miniaturizovaný systém elektrod pro možnost stanovení studované látky v 1 ml objemu vzorku.

Metodou DPV na CPE byly při nalezených optimálních podmínkách (prostředí BR pufru o pH 2 a methanolu v poměru 99:1 (V/V)) naměřeny kalibrační závislosti v deionizované vodě.

Dále byly proměřeny koncentrační závislosti pomocí HPLC s elektrochemickou a spektrofotometrickou detekcí za využití nalezených optimálních podmínek, tj. v mobilní fázi složené z BR pufru pH 5,5 a methanolu v poměru 60:40 (V/V), potenciálem pracovní elektrody +1,2 V a detekční vlnovou délkou 251 nm.

Aplikovatelnost nově vyvinutých metod stanovení carboxinu byla následně ověřena v modelovém vzorku pitné a říční vody, stanovení probíhalo za optimálních podmínek daných metod.

Miniaturizovaný systém elektrod byl při stanovení carboxinu vyhodnocen jako použitelný, avšak dosažená mez detekce není v porovnání s konvenční uhlíkovou pastovou elektrodou příliš uspokojivá. Případná úprava systému a odstranění vyššího šumu by však do budoucna mohla vést k lepším výsledkům.

Při studiu optimálních podmínek sice došlo k úspěšnému zakoncentrování stanovované látky, avšak vzhledem k nízké hodnotě výtěžnosti u nižších koncentrací nebyla předpokládána výrazné snížení meze detekce.

Zjištěné meze detekce použitých metod jsou shrnuty v Tab. 3.18. Z této tabulky je patrné, že ačkoliv se detekční limity všech použitých metod pohybují v řádu  $10^{-7}$ , lze nejnižší koncentrace carboxinu stanovit metodou HPLC se spektrofotometrickou detekcí.

**Tab. 3.18**

Meze detekce voltametrických a chromatografických stanovení carboxinu.

metoda stanovení	$L_D$ – deionizovaná voda	$L_D$ – pitná voda	$L_D$ – říční voda
	(mol·l <sup>-1</sup> )	(mol·l <sup>-1</sup> )	(mol·l <sup>-1</sup> )
DPV (CPE)	$1,1 \cdot 10^{-7}$	$3,2 \cdot 10^{-7}$	$6,1 \cdot 10^{-7}$
DPV (mCPE)	$3,3 \cdot 10^{-7}$	$4,9 \cdot 10^{-7}$	$6,4 \cdot 10^{-7}$
HPLC-ED	$1,1 \cdot 10^{-7}$	$1,6 \cdot 10^{-7}$	$3,1 \cdot 10^{-7}$
HPLC-UV	$8,1 \cdot 10^{-8}$	$1,1 \cdot 10^{-7}$	$2,3 \cdot 10^{-7}$

## 5. POUŽITÁ LITERATURA

1. Večeřa, Z.: *Pesticidy: Výroba, vlastnosti a použití*. Praha, Státní nakladatelství technické literatury 1964.
2. U.S. Environmental Protection Agency: *What is a pesticide?* Dostupné z URL: <[http://www.epa.gov/pesticides/about/index.htm#what\\_pesticide](http://www.epa.gov/pesticides/about/index.htm#what_pesticide)> [cit. 3.3.2013].
3. Vyhláška ministerstva zdravotnictví ČR č. 400/2006. Sbírka zákonů ČR 2006.
4. Kazda, J.: *Chemická ochrana rostlin*. Dostupné z URL: <[http://etext.czu.cz/php/skripta/obsah.php?titul\\_key=56](http://etext.czu.cz/php/skripta/obsah.php?titul_key=56)> [cit. 3.3.2013].
5. Hodgson, E.; Levi, P. E.: Pesticides: An important but underused model for environmental health sciences. *Environmental Health Perspectives* **104**, 97-106 (1996).
6. Wilcok, B.; Fox, M.: Water and pesticides, how well do they mix? *Soil Water* **1**, 18-21 (1987).
7. Faust, S. D.; Aly, O. M.; Water pollution by organic pesticides. *Journal of the American Water Works Association* **56**, 267-279 (1964).
8. Foster, S. S. D; Chilton, P. J.; Stuart, M. E.: Mechanism of groundwater pollution by pesticides. *Journal of the Institution of Water and Environment Management* **5**, 186-193 (1991).
9. Macrae, R.; Robinson, R. K.; Sadler, M. J.: *Encyclopaedia of food science food technology and nutrition*. London, Academic Press 1993.
10. Velišek, J.; *Chemie potravin, 3 díl*. Tábor, Ossisis 1999.
11. Cremllyn, R.: *Pesticidy*. Praha, Nakladatelství technické literatury 1985.
12. Stoytcheva, M. (Ed.): *Pesticides in the Modern World – Trends in Pesticides Analysis*. Rijeka, InTech 2011.
13. Snel, M.; von Schmeling, B.; Edgington, L. V.: Fungitoxicity and structure-activity relationship of some oxathiin and thiazole derivates. *Phytopathology* **60**, 1164-1168 (1970).
14. Ware, G.W.: *Fundamentals of Pesticides: A Self-Instruction Guide*. Thomson publications, Frenso (1986).
15. Worthing, Ch. R (Ed.): *The Pesticide Manual* 8th ed., The British Crop Protection Council, Thorhton Heath 1987.

16. Ana J. G., Jordi M., Gurllermina F.; Pico Y.: Evaluation of Solid-Phase Extraction and Stir-Bar Sorptive Extraction for the determination of Fungicide Residues at low- $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  levels in Grapes by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1050**, 119-127 (2004).
17. Pike, K. S.; Reed, G. L.; Graf, G. T.; Allison, D.: Compatibility of imidacloprin with fungicides as seed treatment control of Russian wheat aphid. *Journal of Economic Entomology* **86**, 586-593 (1993).
18. U.S. Environmental Protection Agency: *Pesticides – RED Facts Carboxin*  
Dostupné z URL:  
<[http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/0012fact\\_carboxin.pdf](http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/0012fact_carboxin.pdf)>  
[cit. 3.3.2013].
19. Michael, A. K.; *Pesticide Profile: Toxicity, Environmental Impact, and Fate*. New York, Chemical Rubber Company Press Incorporated 1997.
20. DellaGreca, M.; Iesce, M. R.; Cermola, F.; Rubino, M.; Isidori, M.: Phototransformation of Carboxin in Water. Toxicity of the Pesticide and Its Sulfoxide to Aquatic Organism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 6228-6232 (2004).
21. Swarna C., Purushotham N. K., Nagendrudu G., Naidu N. V. S. and Saraswathi K.: Spectrophotometric Method for the Determination of Carboxin in its Formulations and Environmental Samples. *E-Journal of Chemistry* **8**, 1680-1685 (2011).
22. Zan, K. L., Chantara, S.: Optimization Method for Determination of Carbofuran and Carboxin Residues in Cabbages by SPE and HPLC-UV. *Chiang Mai Journal of Science* **34**, 227-234 (2007).
23. Luke, M. A., Forberg, J. E., Masumoto, H.: Extraction and cleanup of organochloride, organophosphate, organonitrogen and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International* **58**, 1020-1026 (1975).
24. Rosales, C. N.: Hydrolysis study and extraction of spiroxamine from soils of different physico-chemical properties. *Chemosphere* **77**, 821-828 (2009).
25. Kvíčalová, M., Doubravcová, P., Jobánek, R., Jokešová, M., Očenášková, V., Süßenbeková, H., Svobodová, A.: Application of Different Extraction Methods for the Determination of Selected Pesticide Residues in Sediment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **89**, 21-26 (2012).

26. Maldaner, L., Santana, C. C., Jardim, I. C. S. F.: HPLC Determination of Pesticides in Soybeans using Matrix Solid Phase Dispersion. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **31**, 972-983 (2008).
27. Liu, Ch. H., Mattern, G. C., Yu, X., Rosen, R. T., Rosen, J. D.: Multiresidue Determination of Nonvolatile and Thermally Labile Pesticides in Fruits and Vegetables by Thermospray Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **39**, 718-723 (1991).
28. Fillion, J., Sauvé, F., Selwyn, J.: Multiresidue Method for the determination of Residues of 251 Pesticides in Fruits and Vegetable by Gas Chromatography/Mass Spectrometry and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International* **83**, 698-713 (2000).
29. Adams, R. N.: Carbon paste electrodes. *Analytical Chemistry* **30**, 1576 (1958)
30. Švancara, I.; Vytrás, K.: Příprava a vlastnosti uhlíkových pastových elektrod. *Chemické listy* **88**, 138-146 (1994).
31. Švancara, I.; Ogorevc, B.; Hočevár, S. B.; Vytrás, K.: Perspectives of carbon paste electrodes in stripping potentiometry. *Analytical Sciences* **18**, 301-305 (2002).
32. Švancara, I.; Vytrás, K.; Kalcher, K.; Walcarius, A.; Wang, J.: Carbon paste electrodes in facts, numbers, and notes: A review on the occasion of the 50-years jubilee of carbon paste in electrochemistry and electroanalysis. *Electroanalysis* **21**, 7-28 (2009).
33. Zima, J.; Využití uhlíkových pastových elektrod v analýze léčiv a toxických látek. *Klinická a toxikologická analýza*. Praha, VŠCHT 2008.
34. Cookeas, E. G.; Efstathiou, C.E.: Preconcentration of organic compounds at a diphenyl ether graphite paste electrode and determination of vanillin by adsorptive-extractive stripping voltammetry. *Analyst* **117**, 1329-1334 (1992).
35. Švancara, I.; Schachl, K.: Testing of unmodified carboxin paste electrodes. *Chemické listy* **93**, 490-499 (1999).
36. Olson, C.; Adams, R.N.: Carbon paste electrodes application to anodic voltammetry. *Analytica Chimica Acta* **22**, 582-589 (1960).
37. Kalcher, K.; Kauffmann, J. M.; Wang, J.; Švancara, I.; Vytrás, K.; Neuhold, C.; Yang, Z.: *Electroanalysis* **7**, 5-22 (1995).



38. Lindquist, J.: Carbon paste electrode with a wide anodic potential range. *Analytical Chemistry* **45**, 1006-1008 (1973).
39. Švancara, I.; Vytrás, K.; Barek, J.; Zima, J.: Carbon paste electrodes in modern electroanalysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **39**, 204-227 (2009).
40. Novotný, V.; Barek, J.: Voltametrické stanovení acifluorfenu, nitrofenu a oxyfluorfenu na stříbrné tuhé amalgámové elektrodě a uhlíkové pastové elektrodě. *Chemické listy* **103**, 217-223 (2009).
41. Uslu, B.; Okzan, S. A.: Electroanalytical application of carbon paste electrodes to the pharmaceuticals. *Analytical Letters* **40**, 817-853 (2007).
42. Barek, J.; Fisher, J.; Navrátil, T.; Peckova, K.; Yosypchuk, B.; Zima, J.: Nontraditional electrode material in environmental analysis of biologically active organic compounds. *Electroanalysis* **19**, 2003 (2007).
43. German, N.; Armalis, S.; Zima, J.; Barek, J.: Voltammetric determination of fluoren-9-ol and 2-acetamidofluorene using carbon paste electrodes. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **70**, 292-304 (2005).
44. Němcová, L.; Zima, J.; Barek, J.; Janovská, D.: Determination of resveratrol in grains, hulls and leaves of common and tatary buckwheat by HPLC with electrochemical detection at carbon paste electrode. *Food Chemistry* **126**, 374-378 (2011).
45. Němcová, L.; Barek, J.; Zima, J.: Determination of trans-resveratrol using voltammetric and amperometric methods at carbon fiber rod electrode and carbon paste electrode. *International Journal of Electrochemical Science* **7**, 9221-9231 (2012).
46. Mika, J.: Využití elektrod na bázi uhlíku pro elektrochemickou detekci v průtokových metodách. *Diplomová práce*, UK, Praha (2012).
47. Sigma-Aldrich: *Bezpečnostní list carboxinu*. Dostupné z URL: <<http://www.sigmaaldrich.com/>> [cit. 3.3.2013].
48. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance carboxin. *European Food Safety Authority Journal* **8** (10), 1857 (2010).
49. Jarošová, R.: Stanovení vanilinu na uhlíkové pastové elektrodě. *Bakalářská práce*, UK, Praha (2011).

50. Merck Millipore: *ChromBook 2008/2009*. Dostupné z URL:  
<<http://www.merckmillipore.com/showbrochure/200903.023.ProNet.pdf>>  
[cit. 3.3.2013].